

# **UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

## **FACULTAD DE VETERINARIA**

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos



## **TESIS DOCTORAL**

### **Empleo de sistemas de cohesión en frío para la elaboración de jamón deshuesado curado**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**María Dolores Romero de Ávila Hidalgo**

Directores

María Isabel Cambero Rodríguez  
Lorenzo de la Hoz Perales  
Juan Antonio Ordóñez Pereda

**Madrid, 2014**





UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y  
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



**EMPLEO DE SISTEMAS DE COHESIÓN EN FRÍO PARA LA  
ELABORACIÓN DE JAMÓN DESHUESADO CURADO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**M<sup>a</sup> Dolores Romero de Ávila Hidalgo**

BAJO LA DIRECCIÓN DE LOS DOCTORES

M. Isabel Cambero Rodríguez

Lorenzo de la Hoz Perales

Juan Antonio Ordóñez Pereda

MADRID, 2013





UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y

TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



**EMPLEO DE SISTEMAS DE COHESIÓN EN FRÍO PARA LA  
ELABORACIÓN DE JAMÓN DESHUESADO CURADO**

Memoria que, para optar al grado de  
Doctor, presenta la Licenciada M<sup>a</sup>  
Dolores Romero de Ávila Hidalgo

Madrid, Junio de 2013





Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos

Facultad de Veterinaria

Ciudad Universitaria , s/n. 28040 Madrid  
Teléfono: 91 394 3749. Fax: 91 394 37 43

M<sup>a</sup> ISABEL CAMBERO RODRÍGUEZ, profesora titular de Tecnología de los Alimentos y JUAN ANTONIO ORDÓÑEZ PEREDA, catedrático de Tecnología de los Alimentos, ambos profesores de este Departamento

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada **“Empleo de sistemas de cohesión en frío para la elaboración de jamón deshuesado curado”**, presentada por la Licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos M<sup>a</sup> Dolores Romero de Ávila Hidalgo para optar al grado de Doctor, ha sido dirigida conjuntamente por el catedrático D. Lorenzo de la Hoz Perales (fallecido el 31 de Marzo de 2011) y los que suscriben. Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y cumple con la normativa vigente, por tanto, autorizan su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal que se nombre a tal fin.

Para que conste a los efectos oportunos, firman el presente escrito en Madrid, a 14 de Mayo de 2013.

M<sup>a</sup> Isabel Cambero Rodríguez

Juan Antonio Ordóñez Pereda





Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos

Facultad de Veterinaria

Ciudad Universitaria, s/n. 28040 Madrid  
Teléfono: 91 394 3749. Fax: 91 394 37 43

El trabajo experimental que ha dado lugar a esta memoria ha sido realizado en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, financiado mediante los siguientes proyectos de investigación:

- Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT). AGL04-6773/ALI. Empleo de sistemas de cohesión en frío para la elaboración de jamón deshuesado curado. Secretaria de Estado de Política Científica y Tecnología.
- Programa Consolider-Ingenio 2010. CSD 2007-00016. Productos cárnicos para el Siglo XXI: seguros, nutritivos y saludables.
- Ministerio de Ciencia e Innovación AGL2010-19158. Ensayos de tensión y de adhesión en productos de origen animal. Aplicación a la mejora del envasado de productos loncheados.
- Comunidad de Madrid. Consejería de Educación. Programa de Actividades de I+D entre grupos de investigación de la Comunidad de Madrid. Proyecto “TEMYNISA” CAM.S-0505/AGR-0314. Tecnologías emergentes y procesado mínimo: aplicación a la seguridad química y microbiológica de alimentos listos para el consumo (RTE).
- Comunidad de Madrid. Consejería de Educación. Proyecto CCG07-UCM/AGR-2640.
- Universidad Complutense y Comunidad de Madrid. Grupo de Investigación “920276 - Tecnología de Alimentos de Origen Animal”.



## AGRADECIMIENTOS

*Escribir los agradecimientos de esta Tesis Doctoral significa haber concluido un intenso trabajo realizado en colaboración con muchas personas, tanto en el ámbito laboral como personal. Con estas palabras quisiera transmitir mi más sincero agradecimiento y cariño a todas esas personas que, con su ayuda y dedicación, han hecho posible la realización de este trabajo.*

*En primer lugar a Lorenzo de la Hoz y a M<sup>a</sup> Dolores Selgas, directores de Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos durante el período de realización de este trabajo de investigación, por su apoyo, motivación y comprensión durante estos años.*

*A mis directores de Tesis, M. Isabel Cambero, Lorenzo de la Hoz y Juan Antonio Ordóñez, por confiar en mí y haberme dado esta oportunidad. Gracias por estimular mi curiosidad y por vuestra dedicación y esfuerzo para que este trabajo haya llegado a su culminación. A Isabel, por enseñarme a pensar haciéndome dudar de esas cosas que, cuando le cuento por primera vez tengo tan claras, por su estímulo constante y por proponerme nuevos retos. A Billy, por el apoyo que me dio cuando entré en este Departamento, por la supervisión de mi formación y por sus sabios comentarios cuando parece que todo está terminado. A Lorenzo, aunque ya no está entre nosotros, por su comprensión, pragmatismo y sencillez con la que veía la vida y las cosas, a su lado ¡todo parecía tan fácil, sencillo y claro! Desde que se puso enfermo y mucho más cuando falleció, se nos hizo cuesta arriba continuar este trabajo sin su compañía pero con tiempo, nervios y una mirada hacia delante, lo hemos conseguido. Muchas gracias a los tres.*

*A los profesores, a mis compañeros de laboratorio y a todo el personal del Departamento, por vuestro apoyo y paciencia para enseñarme. Gracias por vuestra ayuda y comprensión en todo este tiempo.*

*A ti, que si estás leyendo estas palabras, es porque, sin duda, has formado parte de mi vida durante esta etapa. Posiblemente, porque hayas trabajado conmigo en el laboratorio de prácticas o en algún lugar la facultad o de la universidad, o porque tengas costumbre de comer en el comedor de abajo o quizás haya sido un saludo, una sonrisa, una aclaración, una pequeña ayuda, una palabra amable o quizás otra cosa que nada tiene que ver con esto, ¡ahora eso da igual! lo importante es que has contribuido a hacer más agradable mi rutina*



diaria en el Departamento. Han sido muchos años y no me gustaría olvidarme ni de ti ni de nadie, así que, esta va a ser la mejor solución. Gracias, de corazón.

A mi familia, por el apoyo, cariño y comprensión que manifiestan día a día. Gracias a mis padres, M<sup>a</sup> Carmen y Santiago, por dedicar todo vuestro esfuerzo en educarnos a mis hermanos y a mí, por haberme inculcado la curiosidad por saber, por haberme animado a solicitar aquella beca que me ha traído hasta aquí y, por supuesto, por enseñarme a luchar por aquello en lo que creo, aunque en ocasiones sea duro, al final produce una gran satisfacción. Muchas gracias por vuestro esfuerzo diario.

A Antonio, por ese viaje que de forma inesperada y día a día, nos ha traído hasta aquí, a formar nuestra familia. Gracias por tu ilusión, tu apoyo constante, tu cariño y tus palabras de ánimo, por no permitirme dudar de mí misma en estos últimos momentos, pero principalmente por tu amor y por estar siempre a mi lado.

A todos, *MUCHAS GRACIAS*

*A mis padres*

*A mi marido Antonio*



---

<b>SUMMARY .....</b>	<b>21</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>37</b>
<b>I.1. LA INDUSTRIA CÁRNICA EN ESPAÑA .....</b>	<b>39</b>
<b>I.2. JAMÓN CURADO.....</b>	<b>41</b>
<b>I.2.1. DEFINICIÓN DEL PRODUCTO .....</b>	<b>41</b>
<b>I.2.2. TIPOS DE JAMONES CURADOS EN EUROPA .....</b>	<b>43</b>
<b>I.2.3. DESCRIPCIÓN ANATÓMICA DEL PERNIL .....</b>	<b>46</b>
<b>I.2.4. PROCESO DE ELABORACIÓN .....</b>	<b>46</b>
<b>I.2.5. FORMAS DE COMERCIALIZACIÓN DEL JAMÓN CURADO .....</b>	<b>49</b>
<b>I.2.6. SISTEMAS DE DESHUESADO.....</b>	<b>50</b>
<b>I.3. PRODUCTOS CÁRNICOS REESTRUCTURADOS .....</b>	<b>51</b>
<b>I.3.1. PRESENTACIÓN Y COMERCIALIZACIÓN DE PRODUCTOS CÁRNICOS             REESTRUCTURADOS.....</b>	<b>52</b>
<b>I.3.2. METODOS DE REESTRUCTURACIÓN .....</b>	<b>53</b>
<b>I.4. AGENTES DE LIGAZÓN O COHESIÓN EN FRÍO .....</b>	<b>56</b>
<b>I.4.1. TRANSGLUTAMINASA .....</b>	<b>57</b>
<b>I.4.1.1. ACTIVIDAD DE LAS TRANSGLUTAMINASAS (TGasas) .....</b>	<b>58</b>
<b>I.4.1.2. MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS TGasas .....</b>	<b>59</b>
<b>I.4.1.3. OBTENCIÓN DE TGasas.....</b>	<b>61</b>
<b>I.4.1.4. TRANSGLUTAMINASA DE ORIGEN MICROBIANO (MTGasa) .....</b>	<b>63</b>
<b>I.4.1.5. ASPECTOS LEGALES RELACIONADOS CON EL USO DE TGasas .....</b>	<b>68</b>
<b>I.4.1.6. PRINCIPALES APLICACIONES DE LAS TGasas EN LA INDUSTRIA                 ALIMENTARIA.....</b>	<b>69</b>

I.4.1.7. APLICACIONES DE LAS TGasas EN LA INDUSTRIA NO ALIMENTARIA .....	71
<b>I.4.2. AGENTES DE LIGAZÓN DERIVADOS DEL PLASMA SANGUÍNEO .....</b>	<b>71</b>
I.4.2.1. CARACTERÍSTICAS, OBTENCIÓN Y APROVECHAMIENTO DE LA SANGRE EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA .....	72
I.4.2.2. FIBRINÓGENO y TROMBINA COMO SISTEMA DE LIGAZÓN EN FRÍO .....	87
I.4.2.3. PLASMA SANGUÍNEO ENRIQUECIDO CON FIBRINÓGENO COMO AGENTE DE LIGAZÓN EN FRÍO .....	94
I.4.2.4. EFECTO COHESIVO DEL SISTEMA FIBRINÓGENO-TROMBINA .....	95
<b>I.5. ANÁLISIS REOLÓGICO .....</b>	<b>97</b>
<b>I.5.1. CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS, MECÁNICAS Y TEXTURA .....</b>	<b>97</b>
<b>I.5.2. COMPORTAMIENTO REOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS SÓLIDOS .....</b>	<b>99</b>
<b>I.5.3. MÉTODOS DE ESTIMACIÓN DE LAS PROPIEDADES REOLÓGICAS Y DE LA             TEXTURA .....</b>	<b>100</b>
I.5.3.1. ANÁLISIS DEL PERFIL DE TEXTURA (TPA) .....	102
I.5.3.2. ENSAYOS DE TRACCIÓN .....	104
<b>I.6. ANÁLISIS ESTRUCTURAL .....</b>	<b>107</b>
<b>I.6.1. IMAGEN DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (IRM) .....</b>	<b>107</b>
I.6.1.1. FUNDAMENTO DE LA RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) .....	108
I.6.1.2. PROCESADO Y OBTENCIÓN DE IMÁGENES DE RMN .....	111
<b>I.6.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB) .....</b>	<b>112</b>
I.6.2.1. FUNDAMENTO DE LA MEB .....	113
I.6.2.2. DETECTORES UTILIZADOS EN MEB .....	114

---

<b>II. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO .....</b>	<b>117</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>125</b>
<b>III.A. MATERIAL .....</b>	<b>127</b>
<b>III.A.1. MATERIAL GENERAL DE LABORATORIO .....</b>	<b>127</b>
<b>III.A.2. REACTIVOS Y DISOLVENTES.....</b>	<b>129</b>
<b>III.A.3. MATERIAL CÁRNICO .....</b>	<b>129</b>
<b>III.A.4. PRODUCTOS EMPLEADOS COMO AGENTES DE LIGAZÓN EN FRÍO .....</b>	<b>129</b>
<b>III.A.5. MATERIAL GENERAL PARA LA PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS CÁRNICAS.....</b>	<b>130</b>
<b>III.A.6. MATERIAL EMPLEADO PARA EL ANÁLISIS REOLÓGICO .....</b>	<b>132</b>
III.A.6.1. ENSAYO DE TRACCIÓN UNIAXIAL DESTRUCTIVO.....	132
III.A.6.2. ANÁLISIS DEL PERFIL DE TEXTURA .....	133
<b>III.A.7. MATERIAL UTILIZADO PARA DETERMINAR LA MICROESTRUCTURA DE LAS MUESTRAS MEDIANTE IMAGEN DE RESONANCIA MAGNÉTICA .....</b>	<b>133</b>
<b>III.A.8. MATERIAL UTILIZADO PARA DETERMINAR LA MICROESTRUCTURA DE LAS MUESTRAS MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO</b>	<b>133</b>
<b>III.B. MÉTODOS .....</b>	<b>134</b>
<b>III.B.1. PREPARACIÓN DE LOS SISTEMAS DE LIGAZÓN .....</b>	<b>134</b>
III.B.1.1. TRANSGLUTAMINASA DE ORIGEN MICROBIANO (MTGasa) .....	134
III.B.1.2. SISTEMA FIBRINÓGENO-TROMBINA .....	134
III.B.1.3. PROTEÍNAS DEL PLASMA SANGUÍNEO DESHIDRATADAS .....	135
<b>III.B.2. PREPARACIÓN DE LOS SISTEMAS CÁRNICOS .....</b>	<b>135</b>
III.B.2.1. ELABORACIÓN DE LAS EMULSIONES CÁRNICAS .....	135

III.B.2.2. ELABORACIÓN DE EMULSIONES CÁRNICAS ADICIONADAS CON AGENTES DE LIGAZÓN EN FRÍO .....	135
III.B.2.3. ELABORACIÓN DE MODELOS CÁRNICOS .....	137
III.B.2.4. REESTRUCTURACIÓN DE PERNILES DESHUESADOS.....	138
III.B.2.5. SALADO Y SECADO DE PERNILES REESTRUCTURADOS .....	139
<b>III.B.3. DETERMINACIONES GENERALES.....</b>	<b>140</b>
III.B.3.1. DETERMINACIÓN DE pH.....	140
III.B.3.2. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE AGUA.....	140
III.B.3.3. DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA.....	140
III.B.3.4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO ACUOSO.....	141
III.B.3.5. DETERMINACIÓN DE CENIZAS.....	141
III.B.3.6. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS .....	141
III.B.3.7. DETERMINACIÓN DE GRASA.....	143
III.B.3.8. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NaCl .....	143
<b>III.B.4. REALIZACIÓN DEL ENSAYO DE TRACCIÓN UNIAXIAL DESTRUCTIVO.....</b>	<b>144</b>
<b>III.B.5. REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS DEL PERFIL DE TEXTURA .....</b>	<b>146</b>
<b>III.B.6. MICROESTRUCTURA DE LAS MUESTRAS MEDIANTE IMAGEN DE RESONANCIA MAGNÉTICA .....</b>	<b>148</b>
<b>III.B.7. MICROESTRUCTURA DE LAS MUESTRAS MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO .....</b>	<b>150</b>
<b>III.B.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>151</b>
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>153</b>
<b>CAPÍTULO 1. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO REOLÓGICO DE DISTINTOS PRODUCTOS CÁRNICOS.....</b>	<b>155</b>

<b>ARTÍCULO 1.1.</b>	Breaking strength of dry fermented sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) and physico-chemical characteristics.....	161
<b>ARTÍCULO 1.2.</b>	Tensile properties of cooked meat sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) parameters and physicochemical characteristics.....	171
<b>ARTÍCULO 1.3.</b>	Tensile test and Texture Profile Analysis (TPA) to monitoring rheological properties of commercial cooked meat products .....	181
<b>ARTÍCULO 1.4.</b>	A study of the mechanical properties of dry cured ham .....	191
 <b>CAPÍTULO 2. ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS Y ESTRUCTURALES DE MIOSISTEMAS GELIFICADOS EN FRÍO POR AGENTES DERIVADOS DE PLASMA SANGUÍNEO (SISTEMA FIBRINÓGENO-TROMBINA Y PLASMA SANGUÍNEO DESHIDRATADO).....</b>		
<b>209</b>		
<b>ARTÍCULO 2.1.</b>	Magnetic Resonance Imaging, Rheological Properties, and Physicochemical Characteristics of Meat Systems with Fibrinogen and Thrombin.....	215
<b>ARTÍCULO 2.2.</b>	Magnetic resonance imaging study of the cold-set gelation of meat systems containing plasma powder .....	225
 <b>CAPÍTULO 3. ESTUDIO DE LA VIABILIDAD DEL SISTEMA TRANSGLUTAMINASA DE ORIGEN MICROBIANO Y DE AGENTES DERIVADOS DEL PLASMA SANGUÍNEO PARA LA REESTRUCTURACIÓN DE PERNILES DESHUESADOS DESTINADOS A LA ELABORACIÓN DE JAMÓN CURADO.....</b>		
<b>239</b>		
<b>ARTÍCULO 3.1.</b>	Microbial transglutaminase for cold-set binding of unsalted/salted pork models and restructured dry ham ....	245
<b>ARTÍCULO 3.2.</b>	A study on the suitability of plasma powder for cold-set binding of pork and restructured dry ham .....	255
<b>ARTÍCULO 3.3.</b>	Dry-cured ham restructured with fibrin.....	273



<b>V. DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	291
V.1. ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES REOLÓGICAS DE PRODUCTOS CÁRNICOS COMERCIALES MEDIANTE ANÁLISIS DE PERFIL DE TEXTURA Y ENSAYOS DE TRACCIÓN .....	293
V.2. ADAPTACIÓN DEL ENSAYO DE TRACCIÓN UNIAXIAL AL ANÁLISIS DE MIOSISTEMAS .....	296
V.3. ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS DE DISTINTOS PRODUCTOS CÁRNICOS.....	304
V.4. ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO MECÁNICO DE TEJIDOS DE JAMÓN CURADO .....	319
V.5. VIABILIDAD DE LOS AGENTES DE LIGAZÓN EN FRÍO DE ORIGEN ANIMAL Y DE LA TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA (MTGasa) PARA LA REESTRUCTURACIÓN DE PERNILES DESHUESADOS. POTENCIAL PARA LA FABRICACIÓN DE JAMÓN CURADO.....	325
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	339
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	343

SUMMARY



---

## USE OF COLD BINDING SYSTEMS FOR THE MANUFACTURE OF CURED DEBONED HAM

Several countries, mainly in the Mediterranean area, manufacture dry-cured hams. There is a great variety of dry-cured hams, differing in the pig breed, type of pig feed, weight of meat, type of cut and processing conditions. In Spain dry-cured ham is manufactured from whole pork legs that have been cut at the level of the ischio-pubic symphysis, including the foot and the bone.

Traditionally ripened ham was commercialized as a whole piece while nowadays the most successful products are the ready-to-eat formats. There has been a clear expansion of the market for deboned dry-cured ham (about 74% for exports), either as whole or as portions (200 – 500 g) or slices (Elizalde, 2008).

The manufacture of dry-cured ham from fresh deboned leg offers advantages during production, storage and transport because the weight and volume of the piece is decreased in a quantity equivalent to the size of the bone. Furthermore, deboned hams are the most suitable for cutting and slicing. All these facts highlight the motivation to develop an adequate procedure to manufacture dry-cured ham using deboned fresh pork legs.

Non-meat ingredients or systems, such as blood clotting factors and transglutaminase (TG) from different sources, have been successfully used as cold meat binders in the manufacture of restructured meat products as well as to improve the stability, texture and consistency of meat and fish gels (Cambero et al., 1991; Jiménez-Colmenero et al., 2005). These cold meat binders are able to establish interactions in myosystems where stromal proteins are also included. There are numerous studies reporting satisfactory results and confirming that these binding systems develop an adequate number of cross-links and as a result the cavities produced in the meat pieces after or as a consequence of the deboning process disappear. In the light of these results, it is suggested that a similar strategy may be used to restructure deboned pork legs, which could then be used to produce dry-cured ham.

The TG is an enzyme that catalyzes the cross-link formation between two protein molecules by an acyl transfer reaction between the  $\gamma$ -carboxyamide group of a peptide-bound glutaminy residue (acyl donor) and a primary amine (acyl receptor) such as the

amino group of lysine. Currently, the TG used in meat industry has a microbiological origin (MTGase) and it has been tested in the manufacture of meat and fish products: i.e. frankfurters, beef protein gels and restructured pork products (Yokoyama et al., 2004).

Plasma derived products, such as fibrinogen-thrombin (F-T) and plasma powder (PP), have been successfully employed as cold-set binding agents. In the case of F-T, thrombin converts the soluble fibrinogen into an insoluble fibrin polymer giving rise to a half-staggered structure called the protofibril. When the protofibrils grow long enough, they aggregate longitudinally to form fibers, that branch occasionally to yield a three-dimensional network fibrin clot or stable fibrin gel (Weisel, 2005). The binding activity of the F-T in myosystems could be related to this mechanism of action.

Recently, a PP product, containing a complex mix of proteins such as serum albumin, globulins and fibrinogen (Roodink and Zuidweg, 2003; Herrero et al., 2009), has been used as a cold-set binding agent. The fibrinogen and other blood plasma proteins and enzymes retain their natural functions and activities in this product, offering several advantages over other cold-binding systems from blood origin (such as F-T). This PP product is a single-component system that is easily stored and preserved; and no changes in colour or flavour have been detected in those meat products that include it in their formula.

The traditional production process of Spanish dry-cured ham includes the following steps: salting, washing-brushing, rest or post-salting, drying-ripening and refinement by aging (cellar phase). The performance of these cold-set binding agents could be affected by this process. As far as the author is aware, the use of these cold-set binders during dry-cured ham processing has not been fully explored yet.

*The main **objective** of this Ph.D. thesis was to assess the efficacy of MTGase as well as cold-set binders from blood origin in restructuring fresh deboned pork leg, in order to produce deboned dry-cured ham.*

The work has been organized into three parts, and several secondary objectives were considered as it is described below:

***Part 1. Study of the rheological behaviour of different meat products.***

This research was conducted to achieve the following objectives:

- 1.1. Study the rheological behaviour of several meat products by uniaxial tensile test and to determine its correlation with texture profile analysis (TPA) parameters and physico-chemical characteristics.
- 1.2. Examine the mechanical behaviour of commercial dry-cured ham.
- 1.3. Optimize the tensile test in order to estimate the binding strength of restructured meat products.

***Part 2. Study of the rheological properties and the structural characteristics of the myosystems obtained after cold gelation induced by agents of blood plasma origin (combination of F-T and PP).***

The aims of this part were:

- 2.1. Study the changes in the rheological properties of meat model systems caused by the incorporation of a cold-set binding agent derived from blood plasma.
- 2.2. Examine the structural characteristics of cold gelified meat model systems by magnetic resonance imaging (MRI).
- 2.3. Evaluate the potential of blood plasma derived agents for cold-set binding in a meat system, and to determine the relationship between rheological characteristics and MRI parameters.

***Part 3. Evaluation of the performance of MTGase and blood derived products (combination of F-T and PP) as cold-set binding agents for restructuring and manufacturing deboned dry ham.***

The objectives of this part were:

- 3.1. Determine the effect of processing factors, such as meat treatment, preparation mode of cold-set binding agents, packing procedure and binding temperature, on the binding parameters in pork model complexes as well as in restructured dry ham that has been manufactured following a traditional-like process.
- 3.2. Study the microstructure of the resulting binding surfaces by scanning electron microscopy (SEM).

Regarding **Material and Methods**, general and specific methodology was used for the development of each part of the research and to achieve the above mentioned objectives.

In **Part 1**, TPA and tensile testing were performed to evaluate the rheological behaviour of commercial meat products (dry fermented sausages, cooked meat sausages and commercial cooked meat products manufactured from entire pieces of meat and dry-cured hams) using a TA.XT2i Stable Micro Systems Texture Analyser (Stable Microsystems Ltd., Surrey, England) with the Texture Expert programmes (Herrero et al., 2007a, 2008; Romero de Ávila et al., 2013).

In general, the TPA procedure required to prepare four cylinders (being their size related to the product). A double compression cycle test was performed to achieve 50% compression of the original height in the portion with an aluminium cylinder probe P/25. A time of 5 s was allowed to elapse between the two compression cycles. Force-time deformation curves were obtained with a 25 kg load cell applied at a cross-head speed of 2 mm s<sup>-1</sup>. The following parameters were quantified: hardness (N, maximum force required to compress the sample), springiness (m, ability of the sample to recover its original form after the deforming force has been removed), adhesiveness (N s, area under the abscissa after the first compression), cohesiveness (extent to which the sample could be deformed prior to rupture), and chewiness (J, work required to masticate the sample before swallowing).

In the tensile test, several pieces (at least five per product) were cut into a dumbbell shape and a dimension according to the product. A load cell of 5 kg was employed. For analysis, one tensile grip (A/TGT) was fixed to the base of the textural analyser while the other one was attached to the load cell, and each sample was placed between both tensile grips. The cross-head speed was 1.0 mm s<sup>-1</sup> until rupture. The rupture force was taken as the maximum force peak height (N) required for breaking the sample. The breaking strength (BS, N cm<sup>-2</sup>) was obtained by dividing the rupture force by the cross-sectional area (thickness × width) of the portion. Finally, the energy to fracture (N mm) was calculated as the area under the deformation curve.

Physicochemical analyses (pH, dry matter, water activity, fat content and salt content) were made to characterize each dry-cured ham sample.

In **Part 2**, meat emulsion model systems (with and without salt) were elaborated with cold-set binding agents derived from blood plasma (F-T system and PP) and their structure was analyzed by MRI and compared to controls manufactured in parallel without binding agents.

All MRI measurements were performed using a Bruker BIOSPEC 47/40 spectrometer (Bruker GmbH, Ettlingen, Germany) operating at 4.7 T (200 MHz) and equipped with a 12 cm diameter actively shielded imaging gradient capable of reaching 200 mT m<sup>-1</sup> along all of the axes. The samples (approximately 4 cm long, 3 cm wide and 1.5 cm thick) were placed in a homebuilt shaped surface coil (4 × 4 cm). A first global shimming was performed, and then three scout spin-echo experiments in axial, sagittal, and coronal direction were acquired to locate the slices in the desired place (Herrero et al., 2007b, 2009).

For measurements of spin-spin ( $T_2$ ) relaxation times, separate images were acquired at 10 echo times (TE = 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, and 200 ms). All other imaging parameters remained constant between images (NA = 1; TR = 3046.1 ms; MTX = 256 × 256; FOV = 4 × 4 cm; slice thickness = 1 mm; number of slices = 10). The data were then fitted to a single-exponential decay, according to the equation:

$$S(TE) = S_0 \exp(-TE/T_2),$$

where  $S(TE)$  is the signal at this echo time (TE) and  $S_0$  is the image signal when TE is equal to zero.

For measurements of spin-lattice ( $T_1$ ) relaxation times separate images were acquired at six recovery times (TR = 310, 510, 1210, 2010, 3010, and 6010 ms); all other imaging parameters remained constant between images (NA = 1; TE = 20 ms; MTX = 256 × 128; reconstructed 256 × 256; FOV = 4 × 4 cm; slice thickness = 1 mm; number of slices = 8). The data were then fitted to an exponential equation:

$$S(TR) = S_0(1 - \exp^{-TR/T_1}),$$

where  $S(TR)$  is the signal at this recovery time (TR) and  $S_0$  is the image signal when TR is equal to zero.

To measure the apparent diffusion coefficient (ADC), separate images were acquired at four diffusion weightings ( $b$  value = 62.8, 370.8, 1131.4, and 2309.5 s mm<sup>-2</sup>). All other imaging parameters remained constant between images (NA = 1; TR =



2000 ms; TE = 75 ms;  $\Delta$  = 50 ms;  $\delta$  = 10 ms; MTX = 256 × 128; reconstructed 256 × 256; FOV = 4 × 4 cm; slice thickness = 1 mm, between slice gap of 0.5 mm; number of slices = 5). For ADC the echo signal intensity was fitted to the equation:

$$ADC = \log(S/S_0)^b,$$

where  $S$  is the signal diffusion weighted and  $S_0$  is the image signal when the value of diffusion weightings ( $b$ ) is equal to zero.

In **Part 3**, to evaluate MTGase and blood derived products (combination of FT and PP) as cold-set binding agents for restructured dry-cured ham, several pork model complexes (elaborated according to different meat treatment, preparation of the cold-set binding agent, packing and binding temperature) and fresh deboned leg were used.

The binding parameters, i.e. binding force (BF) and binding rate ( $k$ ), were determined using the TA.XT2i SMS Stable Micro Systems Texture Analyser. BF was considered as the strength ( $N\ cm^{-2}$ ) required for detach the meat portions bound by the cross-links created by cold-set binding agents (Romero de Ávila et al., 2010, 2013). The other binding parameter,  $k$ , was calculated according to Richard's function that assumes that BF ( $F$ ) increases linearly with time ( $t$ ) from an initial value ( $F_{ini}$ ) to a maximum value ( $F_{max}$ ) (Causton & Venus, 1981; Richard, 1959):

$$dF/dt = k [1 - (\ln F_{ini} / \ln F_{max})]$$

The microstructure of the binding area (meat / cold-set binding agent / meat) in restructured dry hams was analyzed by SEM. Samples were fixed in a 4 % glutaraldehyde buffered physiological solution, dehydrated by gradually increasing ethanol concentration, dried in liquid critical-point carbon dioxide, and subsequently coated with graphite and gold for analysis in a scanning electron microscope (JEOL, mod. JSM-6400) equipped with an Energy Dispersive X ray (EDX) detector.

The results obtained in all three parts were statistical analyzed using a Statgraphics Plus version 5.0. Normal distribution of data (90% confidence) was assessed using the Shapiro–Wilks test. When data fitted a normal distribution, one-way and multi-factor ANOVA analysis was performed. When data did not fit the normal distribution, the Kruskal–Wallis test was used to test the null hypothesis that the medians of variables were the same. Duncan multiple range test were applied for multiple mean comparisons (at 95% or 99% of confidence level), and Pearson product moment

correlations, principal component, simple and multiple regression analysis (Durbin-Watson statistic test, at 95% of confidence level) were performed to determine relationships between data sets. Measured BS of the dry ham samples were fitted to the probability of fracture by the Weibull distribution.

*The most outstanding **results** of this Ph.D. thesis **and its discussion** are described below.*

The results obtained in **Part 1** indicated that, in general, the tensile test can give useful information about the mechanical behaviour of meat products, such as BS. These data could help marketing of meat products, when the probability of rupture of the sliced meat product is a parameter that should be taken into consideration. Moreover, both BS and energy to fracture by the tensile test can be used, together with the TPA, to determine the rheological properties of a variety of meat products such as dry fermented sausages, cooked meat sausages and commercial cooked meat products manufactured from entire meat pieces. These analyses provided complementary information that allowed to group meat products into different typical textural profiles. In general, these textural profiles were characterized by BS, hardness, adhesiveness and cohesiveness values, and included meat products showing markedly different physicochemical characteristics. The rheological behaviour differences could be attributed to variations in the product formulation such as type and amount of meat, fat (Jiménez-Colmenero, 2000) and sugar, starter culture, etc. (Ibáñez et al., 1996) and ripening process (Liepe et al., 1990).

The multivariate analysis confirmed that TPA parameters (cohesiveness, adhesiveness, hardness and springiness) could be used to construct regression models to predict BS. Therefore, a single TPA analysis allows obtaining both the TPA and tensile parameters such as the BS.

A high variability for BS was observed, therefore the assumption that this parameter is given as an average of the experimental results should be questioned. However, the variation in BS obtained during the tensile testing of different tissues of dry ham could be modelled using the Weibull distribution, which can predict the fracture probability of each tissue at different tensile loads (Borrero-López et al., 2009; Dirikolu et al., 2002). *Semimembranous* muscle was the most resistant and also the

most reliable in tensile testing. The rupture of this muscle required 26 N cm<sup>-2</sup> (63% probability), whereas half this force (12.19 N cm<sup>-2</sup>) was sufficient to rupture *semitendinous* muscle with the same probability. Subcutaneous fat showed a similar resistance than *semimembranous* muscle. The differences in the fracture probability reflect the structural characteristics of the different tissues, mainly the amount of collagen, intramuscular fat and the size of the sarcomere (Kristensen & Purslow, 2001; Wheeler et al., 2000) and the way in which these are affected by the dry-cured processing of the ham.

The data obtained in the development of **Part 1** allowed comparing the rheological behavior of the products treated with cold-set binding agents with that of commercial meat products, including dry-cured ham.

In **Part 2**, MRI permitted the quantification of magnetic resonance parameters such as  $T_1$ ,  $T_2$  and ADC. These parameters are potentially sensitive to local variations of water mobility resulting from the modification of interactions between water and macromolecules and changes in tissue structure.

Regarding the addition of cold-set binding agents of the blood plasma origin to meat emulsions, it was observed that both FT and PP produced a gel network. However, the effects of these cold-set binding agents were different depending on the presence or absence of NaCl. Higher mechanical stability of the meat emulsion and high degree of hardness, cohesiveness, springiness and BF were observed in the absence of salt. The study of the meat emulsion structure supplemented with cold-set binding agents by MRI showed higher content of bulk water organized within a porous structure (higher  $T_1$  and  $T_2$ ) and higher diffusive motion of water (high ADC). There was a decrease in hardness, BF,  $T_1$  and ADC and an increase in adhesiveness and  $T_2$  with salt addition. In general, a significant negative correlation was found between hardness and  $T_2$  or ADC. The result of the addition of salt in the meat system with blood derived products could be due to the fact that NaCl limited the fibrin polymerisation and formation of a gel structure. These results could be related with the findings of several authors (Papi et al., 2005; Standeven et al., 2005).

Monitoring the changes in the structure and textural properties of a meat system after the addition of cold-set binding agents and NaCl could help to optimize meat product manufacture conditions.

Finally, in **Part 3**, the results indicated that MTGase and cold-set binding agents of blood plasma origin (combination of FT and PP) can be used for restructuring deboned pork leg to manufacture dry-cured ham on a practical scale since they provided enough stable cross-links in the course of the salting and drying processes. However, specific processing conditions were required for each cold-set binding system. To obtain the highest BF and rate it was necessary: first, to treat the meat surface with a mixture of salts (NaCl, including KNO<sub>3</sub> and NaNO<sub>2</sub>); second, to add MTGase as binding agent; and third, to vacuum pack these meat portions covered by salt. This vacuum packing procedure allowed binding and salting processes to take place simultaneously and effectively during the manufacture of dry-cured ham.

With respect to cold-set binding agents of blood plasma origin, in the case of the FT system, a mixture of 10 parts of fibrinogen with 1 part of thrombin (10:1, v/v) can be used to restructure fresh deboned pork leg when it is applied onto a meat surface that has been pre-treated by immersion in a saline solution; as MTGase was used, this can then be followed by vacuum packing of the meat portions covered in salt for a simultaneous binding and salting processes. For PP, the most appropriate procedure to restructure deboned leg would be to apply plasma proteins, as a powder or rehydrated either in water or 0.5 % NaCl aqueous solution (w/v) onto meat surfaces that had been pre-treated by immersion in a saline solution. PP could also be applied onto untreated meat surfaces.

During drying of the restructured deboned legs, there was an increase in the BF with a concomitant decrease in water content and an increase in the salt content. These results may be due to an increase in covalent cross-links favoured by the increased concentration of protein substrate associated with the modifications occurring during the drying period, i.e., a decrease in the protein solubility and water content (Monin et al., 1997).

The high BF detected reflects the potential of MTGase, FT and PP as a cold-gelling and cold-set binding agents to restructure fresh deboned legs, which could be salted and dried following an analogous process to that of the commercial manufacture of dry-cured ham, since they provides enough stable cross-links.

In general, the microstructure in the binding zone of restructured deboned leg presented a network with few filaments and little interaction. However, as the drying time increased the binding zone of the restructured ham showed a well structured

matrix with high number of interconnected thick strands. This fact may explain why the BF increased along the drying time.

*According to the results obtained, the main **conclusions** of this Ph.D. thesis are the following:*

With regard to **Part 1**,

1. Breaking strength of commercial meat products can be predicted using regression models that are constructed by parameters obtained by texture profile analysis.

2. The breaking strength values of the different tissues from dry-cured ham show high dispersion but they can be modelled using the Weibull distribution, which can predict the fracture probability of each tissue at different tensile loads.

With respect to **Part 2**,

3. The addition of fibrinogen-thrombin to meat emulsions produces a network gel characterized by a higher degree of springiness and hardness. The resulting matrix presents both higher content of bulk water organized within a porous structure and higher diffusive motion of water. The addition of 2% NaCl reduces gel hardness, probably due to binding of chloride ions ( $\text{Cl}^-$ ) to the fibrin fibers.

4. The addition of plasma powder gives high mechanical stability to a meat system (mainly in unsalted systems) that is characterized by an increase in hardness, cohesiveness, springiness and breaking strength. The resulting matrix presents structures with large pores and high water mobility and translational motion. The addition of salt decreases hardness and breaking force and increases adhesiveness and matrix porosity.

5. In meat emulsions supplemented with cold-set binding agents of blood plasma origin, it is possible to obtain simple and multiple regression equations to estimate several textural properties from magnetic resonance imaging parameters and physicochemical characteristics, such as cohesiveness from the ADC and  $T_2$  and hardness from  $T_1$  and water holding capacity.

With regard to **Part 3**,

6. The MTGase provides enough stable cross-links in the course of the salting and drying processes to allow the use of restructured deboned pork leg for manufacturing dry-cured ham on a practical scale. The highest binding force and binding rate are obtained when the meat surface is treated with a mixture of salts (NaCl containing  $\text{KNO}_3$  and  $\text{NaNO}_2$ ) before MTGase treatment and, then, the meat portions covered with salt are vacuum packed. This vacuum packing procedure allows simultaneous binding and salting processes to take place effectively during the manufacture of dry-cured ham.

7. To optimize the process of dry-cured ham manufacture from restructured deboned pork leg using fibrinogen and thrombin system (FT) as cold set binding agent, it is necessary to pre-treat the binding meat surface by immersion in salt solution (NaCl including  $\text{KNO}_3$  and  $\text{NaNO}_2$ ) and to uniformly spread a FT mixture (10/1, v/v) over it; this can then be followed by vacuum packing of the meat portions covered in salt.

8. Plasma powder can be used to restructure fresh deboned leg, which can be salted and dried following a commercial-like process to manufacture dry-cured ham, since plasma powder creates enough stable cross-links, which are increased during the drying period. The most appropriate procedure to restructure fresh pork would be to apply plasma proteins, as a powder or rehydrated either in water or 0.5 % (w/v) NaCl aqueous solution, onto meat surfaces that have been pre-treated by immersion in a saline solution. The plasma powder can also be applied onto untreated meat surfaces thus attaining a high binding force.

Finally, for a production at industrial level of dry-cured ham, it is advisable to use of plasma powder for deboned pork leg restructuring because this cold set binding agent is a single-component system that is easily stored and preserved.

## References

- |   |  |
|---|--|
| <p>Borrero-López, O., Hoffman, M., Bendavid, A., &amp; Matin, P. J. (2009). Reverse size effect in the fracture strength of brittle thin films. <i>Scripta Materialia</i>, 60, 937-940.</p> <p>Cambero, M. I., López, M. O., de la Hoz, L., &amp; Ordóñez, J. A. (1991). Restructured meat.</p> | <p>Composition and binding-properties. <i>Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos</i>, 31, 293-309.</p> <p>Causton, D. R., &amp; Venus, J. C. (1981). <i>The biometry of plant growth</i>. London: Edward Arnold Ltd.</p> |
|---|--|

- Dirikolu, M. H., & Aktaş, A. (2002). Statistical analysis of fracture strength of composite materials using Weibull distribution. *Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences*, 26, 45-48.
- Elizalde, I. (2008). El jamón español se prepara para hablar mandarín. *Expansión, Edición impresa*. March 25.
- Herrero, A. M., Cambero, M. I., Ordóñez, J. A., Castejón, D., Romero de Ávila, M. D., & de la Hoz, L. (2007b). Magnetic Resonance Imaging, rheological properties and physico-chemical characteristics of meat systems with fibrinogen and thrombin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9357-9364.
- Herrero, A. M., De La Hoz, L., Ordóñez, J. A., Castejón, D., Romero de Ávila, M. D., & Cambero, M. I. (2009). Magnetic resonance imaging study of the cold-set gelation of meat systems containing plasma powder. *Food Research International*, 42, 1362-1372.
- Herrero, A. M., de la Hoz, L., Ordóñez, J. A., Herranz, B., Romero de Ávila, M. D., & Cambero, M. I. (2008). Tensile properties of meat cooked sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) parameters and physico-chemical characteristics. *Meat Science*, 80, 690-696.
- Herrero, A. M., Ordóñez, J. A., Romero de Ávila, M. D., Herranz, B., de la Hoz, L., & Cambero, M. I. (2007a). Breaking strength of dry fermented sausages and their correlation with Texture Profile Analysis (TPA) and physico-chemical characteristics. *Meat Science*, 77, 331-338.
- Ibáñez, C., Quitanilla, L., Cid, C., Astiasarán, I., & Bello, J. (1996). Dry fermented sausages elaborated with *Lactobacillus plantarum-Staphylococcus carnosus* part I: Effect of partial replacement of NaCl with KCl on the stability and the nitrosation process. *Meat Science*, 44, 227-234.
- Jimenez-Colmenero, F. (2000). Relevant factors in strategies for fat reduction in meat products. *Trends in Food Science and Technology*, 11, 56-66.
- Jimenez-Colmenero, F., Ayo, M. J., & Carballo, J. (2005). Physicochemical properties of low sodium frankfurter with added walnut: Effect of transglutaminase combined with caseinate, KCl and dietary fibre as salt replacers. *Meat Science*, 69, 781-788.
- Kristensen, L., Purslow, P. P. (2001). The effect of ageing on the water-holding capacity of pork: role of cytoskeletal proteins. *Meat Science*, 58, 17-23.
- Liepe, H., Pueril, E., & Porobic, R. (1990). Influence of sugars and bacteria on dry sausage souring. *Fleischwirtschaft*, 70, 189-192.
- Monin, G., Marinova, P., Talmant, A., Martín, J. F., Cornet, M., Lanore, D., & Grasso, F. (1997). Chemical and structural changes in dry-cured hams (Bayonne hams) during processing and effects of the dehairing technique. *Meat Science*, 42, 29-47.
- Papi, M., Arcovito, G., De Spirito, M., Amiconi, G., Bellelli, A., & Boumis, G. (2005). Simultaneous static and dynamic light scattering approach to the characterization of the different fibrin gel structures occurring by changing chloride concentration. *Applied Physics Letters*, 86, 183901-183903.
- Richard, F. J. (1959). A flexible growth function for empirical use. *Journal of Experimental Botany*, 10, 290-300.
- Romero de Ávila, M. D., Ordóñez, J. A., De la Hoz, L., Herrero, A. M., & Cambero, M. I. (2010). Microbial transglutaminase for cold-set binding of unsalted/salted pork models and restructured dry ham. *Meat Science*, 84, 747-754.
- Romero de Ávila, M. D., Ordóñez, J. A., Escudero, R., Cambero, M. I. (2013). A study of plasma powder for cold-set binding of pork and restructured dry ham. *Meat Science*, under review.
- Roodink, H. B. J., & Zuijdweg, P. (2003). Preparation of blood plasma powder for bonding together pieces of foodstuff, e.g. meat, involves preparing fibrinogen concentrate from blood plasma, and spray-drying fibrinogen concentrate to form powder. *Patent Number(s): WO2003063607-A, WO2003063607-A1, NL1019873C2, AU2003203315-A1, EP1469740-A1, US2005170068-A1*.
- Standeven, K. F., Ariëns, R. A. S., & Grant, P. J. (2005). The molecular physiology and pathology of fibrin structure/function. *Blood Reviews*, 19, 275-288.

- Weisel, J. W. (2005). Fibrinogen and fibrin. *Advances in Protein Chemistry*, 70, 247–256.
- Wheeler, T. L., Shackelford, S. D., & Koohmaraie, M. (2000). Variation in proteolysis, sarcomere length, collagen content, and tenderness among major pork muscles. *Journal of Animal Science*, 78, 958–965.
- Yokoyama, K., Nio, N., & Kikuchi, Y. (2004). Properties and applications of microbial transglutaminase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 447–454.





## I. INTRODUCCIÓN



## I. INTRODUCCIÓN

*En este capítulo se tratan temas de distinta naturaleza para abarcar los diversos factores implicados en las investigaciones que confluyen en el desarrollo de la presente tesis doctoral. Con este objetivo, se analizan varios aspectos de la producción de jamón, elaboración de productos cárnicos reestructurados, naturaleza de los agentes de ligazón en frío y particularidades de la metodología utilizada. En este último punto, se incluyen las bases del análisis de la estructura de miosistemas mediante imagen de resonancia magnética y microscopía electrónica de barrido. Finalmente se aborda el estudio de las características reológicas de alimentos sólidos.*

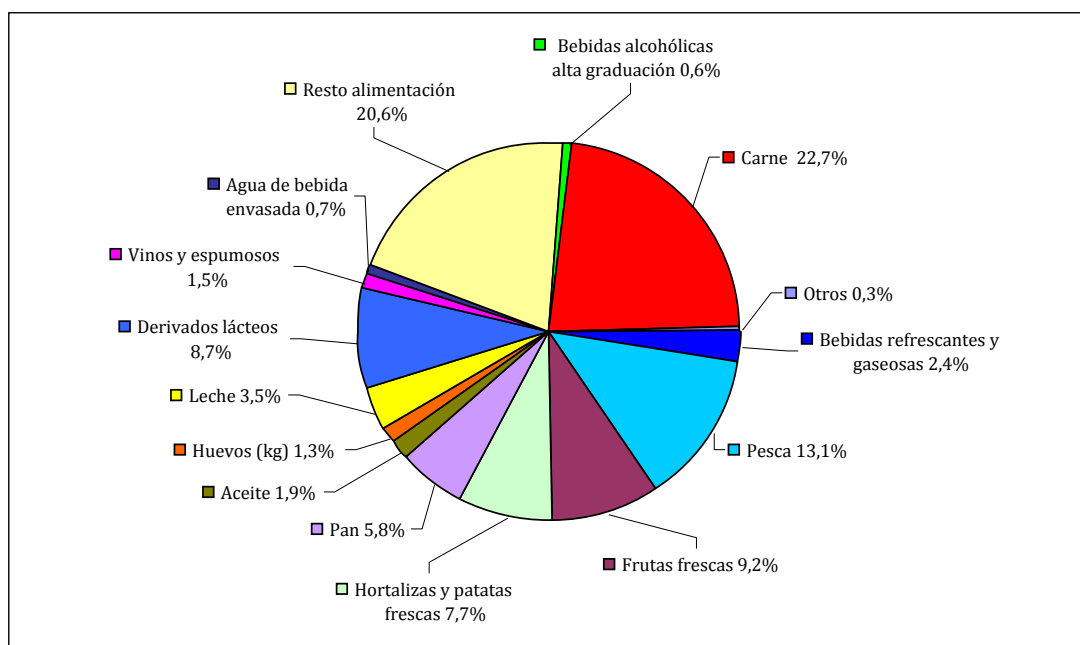
### I.1. LA INDUSTRIA CÁRNICA EN ESPAÑA

Según el último informe del Instituto Nacional de Estadística (INE) sobre la Encuesta Industrial de empresas españolas de 2011, presentado el 11 de diciembre de 2012 (INE, 2012), el sector que más contribuyó al total de la cifra de negocios fue el de la alimentación, con un 18,3%, siendo también el que dio trabajo a un mayor número de personas (16,7% del total). En ese período, el sector cárnico creció un 9,0%, tan sólo superado por la rama de vehículos de motor (11,4%) e industria del petróleo (10,5%). La industria cárnica fue el subsector que presentó la mayor facturación, equivalente a un 24,8% dentro del sector agroalimentario y un 4,5% sobre el total de la industria española. Por otro lado, durante 2011, las exportaciones representaron un 16,2 % del total de ventas de productos alimentarios. Según los últimos datos publicados en 2012 por el INE, la evolución de la cifra de ventas en el sector de alimentación, bebidas y tabaco mostró un incremento del 5,3% respecto a los datos del año anterior. En cuanto al número de empresas cárnicas, se produjo un ligero descenso (de 3.322 a 3.206) desde 2008 hasta 2011, posiblemente como consecuencia de la crisis económica que comenzó en aquel año, de las cuales alrededor del 75% tiene menos de 20 personas ocupadas.

Los últimos datos (2012) sobre el consumo alimentario en España proporcionados por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA) indican que el mayor gasto en alimentación se realiza en los hogares, representando el 67% del total (100.678 millones de euros), siendo un 0,2% más que en 2011, continuando con la tendencia alcista desde 2009. La carne concentra el desembolso mayor dentro del

presupuesto del hogar (22,7%), suponiendo un 1,2% menos que el del año 2011 aunque el consumo se incrementó un 0,8%, de lo que se deduce una ligera rebaja de los precios de los productos cárnicos o un aumento del consumo de carnes de menor coste. El consumo de carnes fue de 2.434.922 Tm, del cual 1.780.676 Tm correspondieron a carne fresca, 80.958 Tm a la congelada y 573.289 Tm a la transformada. La Figura I.1 muestra los porcentajes de los gastos alimentarios domésticos y en la Tabla I.1 se recoge el consumo de carne y productos cárnicos en términos absolutos, su valor en euros y el consumo *per cápita* (MAGRAMA, 2013).

El análisis pormenorizado de la producción de las principales carnes de abasto en nuestro país en los últimos años (Tabla I.2), demuestra claramente el elevado posicionamiento de la carne de porcino. Esta situación responde al consumo directo, favorecido por su precio asequible, y al alto nivel de industrialización del sector. Como es sabido, esta carne se utiliza para la elaboración de un amplio abanico de productos cárnicos, tanto curados como cocidos (Tabla I.3). Estos productos se comercializan en piezas enteras, en porciones (tacos o centros) o loncheados (al corte o envasados). Cabe destacar que en los últimos cinco años se ha producido un notable incremento del consumo de los productos que se comercializan en forma de lonchas y/o envasados frente a las piezas enteras (Tabla I.3).



**Figura I.1.** Esquema sectorial del gasto en el hogar en 2012 (MAGRAMA, 2013).

El mayor incremento en la comercialización de productos envasados (generalmente loncheados) se presenta en los productos cocidos y en jamones y paletas curados (Tabla I.3). En el primer caso, suponen casi el 50 % del total de la producción y en el segundo se aproximan al 35 %, lo que se debe, sin duda, a los cambios que está experimentando la sociedad, que cada vez más demanda alimentos que se comercialicen en porciones pequeñas o individuales y que no requieran mucha preparación, cuadro en el que se enmarcan los denominados productos listos para su consumo (RTE, siglas derivadas de la terminología anglosajona *ready-to-eat*).

	TONELADAS	MILES DE EUROS	CONSUMO PER CÁPITA (kg)
<b>Carne fresca</b>	1.780.676	10.264.239	38,65
Vacuno	293.884	2.657.131	6,38
Pollo	679.772	2.698.950	14,76
Ovino/Caprino	87.078	875.050	1,89
Porcino	491.808	2.796.423	10,68
<b>Carne congelada</b>	80.958	363.999	1,76
<b>Carne transformada</b>	573.289	4.701.501	12,44
<b>Total</b>	2.434.922	15.329.740	52,85

**Tabla I.1.** Consumo de carne y productos cárnicos transformados en los hogares españoles en el año 2012 (MAGRAMA, 2013).

## I.2. JAMÓN CURADO

### I.2.1. DEFINICIÓN DEL PRODUCTO

El Real Decreto 1376/2003 por el que se establecen las condiciones sanitarias de producción, almacenamiento y comercialización de las carnes frescas y sus derivados en los establecimientos de comercio al por menor, distingue entre preparados cárnicos y productos cárnicos. Unos y otros se diferencian, de acuerdo con las definiciones, en aspectos estructurales; así, los primeros son “los productos elaborados con las carnes o las carnes picadas, a las que se les hayan añadido otros productos alimenticios, condimentos o aditivos y/o que hayan sido sometidas a un tratamiento insuficiente para modificar la estructura celular de la carne en la parte central de la superficie de corte y hacer desaparecer así las características de la carne fresca”. En cambio, este RD define los productos cárnicos como “productos elaborados a partir de carne o con carne mediante un tratamiento que permita comprobar la desaparición de las características de la carne fresca en la parte central de la superficie de corte”.

	2008	2009	2010	2011
<b>Bovino</b>	673.684	692.923	669.497	627.764
<b>Porcino</b>	3.972.147	3.818.672	3.724.482	3.689.092
<b>Ovino</b>	165.736	144.202	168.728	138.772
<b>Caprino</b>	6.736	5.720	4.630	5.326
<b>Pollo</b>	1.285.814	1.224.934	1.247.213	1.365.994
<b>Equino</b>	3.154	3.295	4.168	6.947

**Tabla I.2.** Producción española de los principales tipos de carne (toneladas)  
(INE, 2013).

Por otra parte, el Real Decreto 1469/2007 por el que se aprueba la norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo ibéricos, define al jamón curado como el “producto elaborado con la extremidad posterior (del cerdo), cortada a nivel de la sínfisis isquiopubiana, con pata y hueso, que incluye la pieza osteomuscular íntegra, procedente de cerdos adultos, sometido al correspondiente proceso de salazón y curado-maduración”.

	2008	2009	2010	2011	2012
<b>Jamón y paletas curados</b>	<b>114.102</b>	<b>113.162</b>	<b>110.496</b>	<b>106.445</b>	<b>108.933</b>
Jamón y paletas curados enteros	68.946	67.621	63.963	59.211	63.192
Jamón y paletas curados en lonchas	45.156	45.541	46.533	47.234	45.741
<b>Jamón curado normal</b>	<b>78.877</b>	<b>75.317</b>	<b>73.776</b>	<b>69.280</b>	<b>72.768</b>
Jamón curado normal entero	45.077	40.585	38.417	33.272	37.367
Jamón curado normal en lonchas	33.800	34.731	35.359	36.008	35.402
<b>Otras salazones</b>	<b>17.587</b>	<b>19.382</b>	<b>18.549</b>	<b>17.947</b>	<b>17.912</b>
Otras salazones al corte	11.637	12.981	11.612	11.173	11.325
Otras salazones envasadas	5.950	6.401	6.937	6.774	6.587
<b>Otros productos curados</b>	<b>21.432</b>	<b>20.321</b>	<b>21.407</b>	<b>20.280</b>	<b>21.473</b>
Otros productos curados al corte	9.403	8.835	8.022	7.447	7.857
Otros productos curados envasados	12.029	11.486	13.384	12.832	13.615
<b>Jamón cocido</b>	<b>72.654</b>	<b>69.540</b>	<b>66.940</b>	<b>66.969</b>	<b>69.061</b>
<b>Cocidos y otros</b>	<b>17.249</b>	<b>17.282</b>	<b>17.908</b>	<b>18.471</b>	<b>20.642</b>
Cocidos y otros al corte	4.674	4.020	3.451	3.463	4.291
Cocidos y otros envasados	12.575	13.263	14.457	15.007	16.350
<b>TOTAL</b>	<b>321.900</b>	<b>315.005</b>	<b>309.077</b>	<b>299.391</b>	<b>310.788</b>

**Tabla I.3.** Evolución de la producción (toneladas) de derivados cárnicos en España en los últimos cinco años (MAGRAMA, 2013).

Este Real Decreto precisa que el curado-maduración es “el tratamiento de los productos embuchados crudo-adobados y salazones cárnicas en condiciones ambientales adecuadas para provocar, en el transcurso de una lenta y gradual reducción de la humedad, la evolución de los procesos naturales de fermentación o enzimáticos necesarios para aportar al producto cualidades organolépticas características y que garantice su estabilidad durante el proceso de comercialización”. A esta definición habría que añadir, al menos en el caso del jamón curado, los “procesos químicos”, ya que, como se indicará en esta memoria, estos fenómenos, como la autooxidación lipídica o reacción de Streaker, adquieren también importancia durante la maduración de este producto.

### **I.2.2. TIPOS DE JAMONES CURADOS EN EUROPA**

El jamón curado es un producto típico de muchos países mediterráneos, aunque también se produce en otras zonas geográficas. Entre los principales productores de este producto cárnico destacan, además de España, Italia, Francia y Portugal.

Los países integrados en la Unión Europea (UE) elaboran diversos tipos de jamones curados con perfiles morfológicos externos muy variados. Las diferencias en el peso de las piezas anatómicas y la conformación de las mismas permiten identificar a simple vista, o al menos inferir, el origen del producto, aunque a veces se puede errar. Así, es fácil, por ejemplo, distinguir el jamón de Parma (piezas redondeadas y de gran peso) del ibérico (configuraciones alargadas y más ligeras) pero resulta más complicado asegurar cuando un jamón curado procedente de cerdos de razas blancas ha sido elaborado bajo una u otra denominación de origen de España. Más difícil aún, es la identificación del producto loncheado, exceptuando, quizás, las lonchas de jamón ibérico. La preparación de las piezas y las distintas formas de perfilado son factores que adquieren también cierta relevancia, ya que implica la separación de la grasa de cobertura, de la fracción circundante a la cabeza del fémur y de algunas zonas de la piel o corteza; es típico, por ejemplo, el corte serrano en “V” de muchos jamones producidos en España o la eliminación, o no, de la pezuña para su comercialización.

Los jamones elaborados en el sur de Europa se caracterizan por la presencia de zonas musculares sin cubrir de grasa o de piel, y se obtienen mediante la aplicación de técnicas de salado en seco, sin incluir una fase de ahumado, mientras que algunos tipos



de jamones producidos en los países del norte de Europa, Península Balcánica, algunas zonas de Portugal, en la región oriental de Italia y localmente en algunas áreas del norte de España, se ahúman durante su proceso de elaboración.

Algunos de los factores que, típicamente, marcan diferencias en la elaboración de jamones de distintos países productores, se mencionan a continuación:

- Los países del área mediterránea prefieren jamones procedentes de cerdos cuyo tejido muscular presenta cierta cantidad de grasa infiltrada, mientras que los del norte de Europa optan por los fabricados a partir de animales fundamentalmente magros.
- En España se mantiene el hueso coxal, pero en Francia e Italia se elimina para favorecer la penetración de sal y salida de agua. Aun así, mantienen una pequeña parte del hueso, denominada “ancheta” para evitar la formación de cavidades que obstaculicen el secado.
- Los jamones españoles serranos e ibéricos, los italianos de San Daniele y los chinos Jinhua Ham mantienen la pezuña en las piezas, mientras que el italiano de Parma, el francés de Bayona y el checo de Kraski prsut la eliminan.
- En general, la elaboración de jamones en el sur de Europa implica largos procesos de curación sin ahumado, mientras que en el norte de Europa los tiempos de curación suelen ser cortos y se incluye una fase de ahumado. Estas formas de elaboración derivan de prácticas tradicionales realizadas para acomodarse a las condiciones climáticas de cada zona.
- En la salazón que se realiza en la cuenca mediterránea se emplea sal común sin refinar que contiene muchas impurezas, entre ellas nitritos. En cambio, en el norte de Europa, debido a los reducidos tiempos de curación, resulta más conveniente utilizar una sal común más refinada acompañada de la adición de nitritos.

La mayoría de los jamones curados que se elaboran en Europa proceden de cerdos blancos alimentados con piensos concentrados comerciales en explotaciones con sistemas intensivos, vinculados a los genotipos más empleados industrialmente, como Large White, Pietrain, Landrace o de sus cruces. En general, los cerdos se sacrifican a los 5-6 meses de edad cuando han alcanzado 100-120 kg de peso, con la excepción de

los destinados a la elaboración del jamón de Parma, que se sacrifican con 8-9 meses de edad y con un peso de 160-180 kg. En España los cerdos ibéricos y en Córcega los corsos se crían mediante un sistema tradicional en explotaciones extensivas; los animales se sacrifican con 18-24 meses de edad debido a su lento crecimiento, lo que, por otra parte, influye notablemente en la calidad de la carne y en el grado de engrasamiento, que se manifiesta fundamentalmente durante los últimos cuatro meses del período de cebo, coincidiendo normalmente con el último mes de otoño y los meses de invierno.

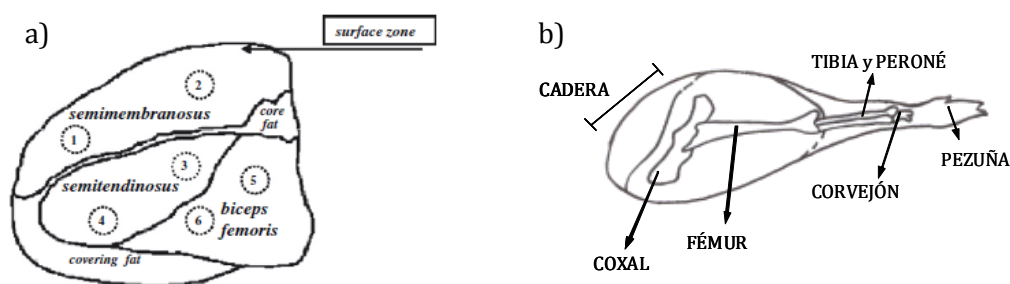
No todos los jamones curados de cerdo blanco producidos en España son iguales, ya que sus características dependen de diversos factores relativos al animal, tipo de crianza, alimentación, edad de sacrificio y proceso de elaboración; relacionado con este último cabría mencionar los sistemas de secado-maduración y los métodos tradicionales de fabricación de las diversas regiones geográficas. Estos factores proporcionan al producto final unas características físicas y sensoriales peculiares.

La UE despliega una política que favorece la producción de calidad garantizada que refrenda mediante el etiquetado de los productos con Denominación de Origen Protegida (D.O.P.), Indicación Geográfica Protegida (I.G.P.) y Especialidad Tradicional Garantizada (E.T.G.). En este contexto, cabe mencionar:

- a) Las D.O.P. correspondientes a jamones italianos como el jamón de Parma y el jamón San Daniele.
- b) Las I.G.P. de jamones franceses donde los principales son el jamón de Bayona, el de Saboya y el de Ardenas.
- c) Jamones alemanes como el de Westfalia (el más conocido), el de Ammerland, el de Ammerland deshuesado y el de la Selva Negra, los tres últimos con I.G.P.
- d) Jamones españoles donde los más conocidos son el jamón Serrano (con E.T.G.) y el jamón Ibérico, del que existen cuatro D.O.P: Dehesa de Extremadura, Guijuelo, Jamón de Huelva y Jamón de Teruel.
- e) Existen otros jamones europeos, como el jamón del Tirol en Austria, el de Ardenas en Bélgica, y en Portugal, el *presunto* de Barrancos (con D.O.P.) y el *presunto* de Barroso (con I.G.P.).

### 1.2.3. DESCRIPCIÓN ANATÓMICA DEL PERNIL

El pernil es la pieza anatómica que se obtiene de la canal porcina después de seccionar la sínfisis isquiopubiana. Se compone de (Figura I.2.): a) los huesos coxal, fémur, tibia, tarso, metatarso y falanges; b) las masas musculares correspondientes a los músculos bíceps femoral, semitendinoso, tensor de la fascia lata, glúteo superficial, glúteo medio, glúteo profundo, obturador interno, gemelos, aductor, *gracilis*, pectíneo, iliopsoas, cuádriceps femoral, sartorio, poplíteo, gastronemio y sóleo; c) la grasa de cobertura y d) la piel (Olmos, 2006).



**Figura I.2. a)** Corte transversal de un pernil (Fantazzini y col., 2009).

**b)** Esquema de la disposición de los huesos en un pernil (Elaboración propia).

### 1.2.4. PROCESO DE ELABORACIÓN

La fabricación de jamón se viene realizando desde tiempos inmemoriales y se estima que en España ya se hacía en la época de los celtas. Sin lugar a dudas, el proceso de curación del jamón surgió, al igual que el de otros muchos productos (por ejemplo, la maduración del queso o el salazonado de pescado) como un medio de evitar la alteración del producto fresco y disponer así de alimento durante el mayor tiempo posible. En esencia, son dos los fenómenos en los que se basa la elaboración de un jamón curado: adición de sal y deshidratación, con lo que se consigue estabilizar microbiológicamente el producto. El tiempo y las condiciones atmosféricas se ocuparán posteriormente de conferir los peculiares atributos sensoriales que caracterizan al jamón y que surgen de complejas reacciones microbiológicas, químicas y bioquímicas e interacciones entre ellas. Lo que siglos atrás era un procedimiento de conservación del alimento no debe entenderse actualmente únicamente como tal, sino también como una verdadera transformación de la materia prima, la carne, con el fin de ofrecer a la

población una diversificación de productos cárnicos. Además, supone un beneficio económico importante en la cadena de valor de esta materia prima, ya que el producto final tiene un alto valor añadido derivado de la gran aceptación por los consumidores como consecuencia de sus exquisitas propiedades sensoriales.

En la actualidad, la producción de jamón curado ha dejado de ser un “arte” para convertirse en un proceso mayoritariamente industrial, aunque los fundamentos siguen siendo los mismos que regían la elaboración tradicional. Cada vez son más las industrias cárnicas que fabrican jamones con tecnologías avanzadas, con programas industriales e informáticos que controlan exhaustivamente las variables del proceso, consiguiéndose una calidad relativamente uniforme, meta anhelada por cualquier industria moderna.

La producción de jamón curado comprende una serie de etapas que se detallan a continuación (Ventanas y col., 2001):

1) *SELECCIÓN DEL PERNIL*. El primer paso para la elaboración de jamón es la elección de la materia prima (pernil). Esta se basa en factores extrínsecos (genética del animal, edad y peso al sacrificio, sexo, alimentación y sistemas de explotación) e intrínsecos (fundamentalmente capacidad de retención de agua [CRA], contenido de grasa y evolución del pH después del sacrificio). El pH del pernil es de especial relevancia porque hay que evitar las carnes DFD (*dark, firm and dry* o carnes oscuras, firmes y secas), ya que, debido a su gran CRA, serían un obstáculo para una correcta deshidratación (Toldrá, 2002).

2) *PREPARACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA*. La primera de las operaciones que se aplican al pernil es el perfilado, que consiste en la eliminación de porciones de musculatura, grasa y piel, para conferir a las piezas las proporciones y características típicas de la conformación de los diferentes tipos de jamones. Posteriormente, se procede al sangrado del pernil, en el que se procura la evacuación mediante presión, manual o mecánica, de restos de sangre remanentes en la musculatura, con el fin de minimizar la posible alteración microbiológica.

3) *SALADO*. La finalidad de esta etapa es la incorporación de las denominadas globalmente sales del curado, compuestas por cloruro sódico, sales nitrificantes (nitratos y nitritos) y coadyuvantes del curado (azúcares y ascorbatos) cuya finalidad es potenciar el sabor, crear condiciones desfavorables para la multiplicación de la

microbiota alterante y patógena y regular las actividades bioquímicas que acaecen durante la maduración.

El sistema tradicional de salado consiste en la frotación manual de los perniles con las sales y el posterior ordenamiento de las piezas en pilas que se cubren totalmente por la mezcla de sales. En la actualidad, estas pilas se han sustituido por contenedores o estanterías, con lo que se consigue un mayor control del proceso y se facilita la manipulación con medios mecánicos. En cualquier caso, los perniles están en contacto íntimo con las sales del curado durante un tiempo que varía en función de su tamaño, y que en la actualidad suele ser de 0,7 día/kg de peso. Una variedad más del salado consiste en introducir las piezas cárnicas en bombos giratorios de salado o “masajeadores” durante un tiempo generalmente no superior a cinco minutos. Posteriormente, los perniles se salan en estanterías. Este procedimiento permite reducir el tiempo de contacto con las sales del curado.

La temperatura durante el salado puede considerarse como un factor regulador de la duración del mismo. En las instalaciones actuales, se mantiene siempre por encima de 1 °C (para que no cristalice el agua) y por debajo de 3 °C (para impedir el crecimiento de *Clostridium botulinum*). La humedad relativa de las cámaras de salado se mantiene en torno a 90 %, o incluso superior, para impedir en la medida de lo posible la evaporación del agua, que por ósmosis, afloraría a la superficie desde el interior de los perniles.

4) *REPOSO*. Después del salado de los perniles, debe eliminarse el exceso de sal e impurezas que se encuentren en la superficie. Para ello, las piezas se lavan con agua fría, se cepillan y se colocan en cámaras para escurrirlas donde seguidamente se someten a un masaje mediante presión de las masas musculares laterales para desplazarlas hacia el centro y darles la forma adecuada. Posteriormente, se trasladan a unas cámaras de post-salado refrigeradas (2-4 °C) haciendo descender la humedad relativa desde el 85 hasta el 75 %. En estas cámaras permanecen entre 1 y 3 meses, produciéndose una merma del 10–12 % que conlleva un descenso de la actividad de agua ( $a_w$ ) hasta valores inferiores a 0,96–0,92. En esta fase se alcanza lo que se conoce como “asentamiento de las piezas”, que corresponde a una distribución homogénea de las sales del curado en toda la pieza.

5) *SECADO-MADURACIÓN*. En esta etapa se estabiliza el color y se produce una deshidratación adicional que asegura la estabilización del jamón. Esta fase es la más

larga (desde meses en los cerdos de raza blanca hasta más de un año en los ibéricos) y es crucial para el desarrollo del sabor y aroma merced a reacciones de degradación (proteólisis, lipólisis y oxidaciones) y síntesis (generación de moléculas sápidas de bajo peso molecular y volátiles).

Esta etapa se realiza en secaderos industriales y/o bodegas y se caracteriza por tener lugar a una temperatura más elevada y una humedad relativa más baja que las fases anteriores. Las variaciones de temperatura y humedad se producen de forma suave y paulatina, considerando que la temperatura oscila desde los 7-9 °C hasta los 28-30 °C y la humedad relativa se reduce hasta un 85 %. Al tener una temperatura más elevada, la grasa se funde e impregna las fibras musculares e incluso puede llegarse a enmascarar la identidad del miosistema, lo que se conoce como “sudado del jamón”. El período en el que se alcanza la temperatura máxima se conoce como “estufaje”. Transcurrido este período, el jamón se somete a un proceso de afinado en bodega para favorecer las reacciones que dan lugar a los compuestos responsables de las características organolépticas del producto acabado.

#### **1.2.5. FORMAS DE COMERCIALIZACIÓN DEL JAMÓN CURADO**

La demanda actual de los consumidores, las nuevas formas de logística y transporte y las diferentes técnicas de comercialización han permitido que el jamón (y la paleta) curado se encuentre disponible en el mercado bajo diferentes formas comerciales, ya sea como piezas enteras, deshuesadas o no, troceadas en centros y diversas porciones, cortadas en tacos, tiras o lonchas. La comercialización en formatos más variados, cómodos, y en tamaños acordes con la demanda de los consumidores, junto a las formas de envasado que permiten una mejor conservación de sus características sensoriales, facilita la difusión del producto en distintos países. Como ejemplo, puede mencionarse el aumento que en sólo un año ha sufrido la exportación de jamón deshuesado (en torno al 74 % del total exportado), principalmente en raciones domésticas envasadas a vacío o en atmósferas modificadas (MAP, siglas derivadas de la terminología anglosajona *modified atmosphere packaging*). En 2011 se exportaron a la UE (solamente Alemania, Francia, Portugal, Italia y Reino Unido) 3.106,3 Tm; a Estados Unidos (EE. UU.) 94,4 Tm; a Latinoamérica (Méjico, Chile y Brasil) 232,9 Tm; a Japón y Hong Kong 368,3 Tm y a otros países 136,5 Tm. Hasta septiembre de 2012, las exportaciones se habían cuadruplicado aproximadamente en los tres primeros

destinos, eran prácticamente del mismo nivel en el caso de Japón y Hong Kong, y en el grupo de “otros” (sobre todo Bélgica y Holanda, donde se exportaron 1.220 Tm) supuso un incremento por un factor de 18. El valor del mercado pasó de 38,7 M€ en 2011 a 153,7 M€ hasta septiembre de 2012, es decir, se cuadruplicó (CONFECARNE - ANICE, 2013).

Analizando el mercado nacional, se observa que alrededor del 50% del jamón curado se comercializa en piezas, mientras que los centros suponen un 34 %. La venta en porciones representa aproximadamente el 7 %, los envasados al vacío alrededor del 5 % y los tacos y tiras un 2 %.

Cabe añadir que, el envasado a vacío es uno de los factores que más ha contribuido a proporcionar una imagen atractiva del jamón curado, debido a que permite un mayor aprovechamiento de las piezas, evita el secado excesivo durante el almacenamiento y los problemas de invasión y reproducción de parásitos.

### **1.2.6. SISTEMAS DE DESHUESADO**

Los datos de producción de jamón curado mencionados en apartados anteriores evidencian la importancia cuantitativa y la clara expansión de la comercialización de piezas deshuesadas, tanto enteras como en porciones o en lonchas. En la aceptación del jamón deshuesado se encuentran implicados diversos factores entre los que pueden destacarse:

- La disposición de porciones de geometría más regular y aspecto más homogéneo.
- Una imagen más estética y atractiva, especialmente para el mercado exterior en países no familiarizados con las piezas enteras.
- Facilita el corte al detallista. Posibilita un corte rápido con máquina a medida que se consume o se vende. Esta forma de presentación resulta de gran utilidad en centros comerciales y para el consumo doméstico.
- Eliminación de problemas relacionados con la presencia de hueso como coquera, defectos de “cala”, etc.

En la actualidad, se está elaborando jamón deshuesado curado básicamente por tres procedimientos (Arnau, 1993). El más extendido consiste en extraer los huesos al final de la maduración. Estas piezas se comprimen (80-100 kg/cm<sup>2</sup>) y compactan para darles una forma más o menos paralelepípeda que permita un loncheado regular. Finalmente se envasan al vacío manteniendo la estructura resultante. Otro procedimiento consiste en deshuesar durante el secado, una vez que las sales del curado se han repartido uniformemente. Este proceder facilita la operación de extracción de las porciones óseas y la conformación de las piezas. Para proseguir la maduración, esta técnica requiere el sellado de las oquedades resultantes del deshuesado con diversos materiales (grasa, ceras, etc.). El deshuesado también puede realizarse de forma parcial antes del salado y finalizarse en el secado. Algunas industrias están realizando el curado de perniles deshuesados en fresco con un considerable recorte de las piezas y notables modificaciones del proceso convencional.

A pesar de emplearse estos procedimientos, las industrias del sector no encuentran que la elaboración de jamones deshuesados curados esté totalmente resuelta. El procedimiento de extracción de huesos al final de la maduración no conlleva problemas tecnológicos adicionales pero requiere disponer de personal y medios especializados. Por otra parte, reduce significativamente el rendimiento del proceso al “curarse” y tratarse un material que hay que desechar al final. El deshuesado a mitad de la maduración tiene inconvenientes similares al método anterior, a los que hay que añadir la necesidad de rellenar las oquedades para evitar la difusión de la amplia microbiota externa existente. El deshuesado en fresco de los perniles es el menos desarrollado, y todavía se requieren investigaciones para conseguir la conveniente conformación de las piezas de forma que puedan incluirse en un proceso similar al de los perniles íntegros. Esto podría conseguirse siguiendo un procedimiento similar al utilizado en la elaboración de productos cárnicos reestructurados.

### **1.3. PRODUCTOS CÁRNICOS REESTRUCTURADOS**

El término de producto reestructurado surgió a principios de los años 70 del pasado siglo para denominar a los productos elaborados a partir de porciones cárnicas y de pescado, troceadas en porciones más o menos grandes e incluso trituradas y reducidas a pasta fina, que se comercializaban como productos crudos (refrigerados o congelados) o como precocinados o cocinados (Mandigo, 1988; Vigneron, 1988). En la



actualidad, este término tiende a limitarse a aquellos productos en los que se intenta imitar el aspecto de una pieza de carne íntegra (Mandigo, 1988; Vigneron, 1988; Cambero y col., 1991, 2001).

Con la metodología de la reestructuración se pretendía brindar a la industria cárnica la posibilidad de elaborar productos de textura consistente y un aspecto muy similar al de un filete, al de un trozo de carne para asar o al de una determinada pieza cárnica, partiendo de porciones cárnicas de diverso tamaño (desde pequeños músculos hasta un fino picado o pasta fina), generalmente de textura deficiente y difícil comercialización (por ejemplo, por proceder de recortes de carne surgidos durante el despiece de las canales). Estos productos pueden moldearse y comercializarse en porciones regulares e individuales propicias para una preparación culinaria sencilla y rápida, ajustándose a las demandas de la denominada cocina rápida. Por otra parte, cabe la posibilidad de poner en el mercado productos cárnicos de composición garantizada o fortificados con distintos componentes (nutricionales, funcionales, etc.) (Cambero y col., 2001).

Básicamente, la elaboración de un producto cárnico reestructurado, o reconstituido, se fundamenta en conseguir un elemento de “unión” que establezca interacciones entre las porciones cárnicas que lo constituyen, dando así consistencia al conjunto. Esta “unión” puede adquirirse en virtud de las propiedades funcionales de las proteínas miofibrilares y/o mediante diversos componentes no cárnicos (Cambero y col., 1991).

### **I.3.1. PRESENTACIÓN Y COMERCIALIZACIÓN DE PRODUCTOS CÁRNICOS REESTRUCTURADOS**

El primer prototipo de filete de carne reestructurada se presentó en 1969 ante el National Pork Producers Council (EE. UU.) por la Universidad de Nebraska. Este producto fue el resultado de investigaciones realizadas con el objetivo de desarrollar productos cárnicos adecuados para la cocina rápida y la alimentación de grandes colectivos (fuerzas armadas, líneas aéreas, hospitales, restaurantes y cafeterías). Los productos reestructurados que se encuentran actualmente en el mercado de distintos países, se presentan como filetes o imitando el aspecto de ciertas porciones cárnicas y

piezas de carne para asar. De acuerdo a la forma de comercialización pueden establecerse tres familias o grupos de productos:

- Crudos-ultracongelados. El estado de congelación facilita que los productos mantengan la forma y consistencia hasta su preparación culinaria.
- Crudos-refrigerados. Son los productos que requieren un proceso de elaboración más cuidadoso, tanto por su aspecto visual, al ofrecerse como productos frescos, como por su consistencia. Con frecuencia, se recurre al envasado a vacío o en MAP para ampliar su vida útil.
- Precocinados o cocinados. El proceso culinario asegura la estabilidad y cohesión de estos productos. La forma de presentación es muy variada (cubos, lonchas, porciones, etc.).

Las cadenas de distribución y restauración de distintos países ofrecen una amplia variedad de productos reestructurados elaborados con carnes de diversas especies (cerdo, vacuno, ovino, aves). Para el formado o moldeado de estos productos pueden utilizarse distintos sistemas, desde la simple embutición en bolsas de plástico cerradas a vacío, hasta complejas operaciones de extrusión y coextrusión que permiten obtener productos que imitan cortes cárnicos con músculos de distintas tonalidades. Un ejemplo típico de producto cárnico reestructurado es la chuleta para barbacoa, con una forma similar a la porción obtenida por el corte de un costillar que incluso presenta una hendidura en uno de los lados para simular el hueco del hueso.

### **1.3.2. METODOS DE REESTRUCTURACIÓN**

Las porciones de carne a reestructurar generalmente se someten a una serie de operaciones preliminares destinadas a eliminar restos óseos, exceso de grasa y tejido conjuntivo. El proceso de elaboración de los productos cárnicos reestructurados implica, fundamentalmente, operaciones de reducción de tamaño, mezcla y moldeado.

La cohesión necesaria para que los productos cárnicos reestructurados mantengan la estabilidad puede conseguirse por dos procedimientos:

- a) Recurriéndose a la capacidad de ligazón y de gelificación de las proteínas miofibrilares. Se trata de productos reestructurados estabilizados por el calor.

- b) Utilizando compuestos no cárnicos capaces de establecer interacciones entre sí y/o con los componentes de la carne en frío, sin necesidad de recurrir al tratamiento térmico. Puede hablarse por tanto de una reestructuración en frío.

Seguidamente se detallan algunos aspectos de estas formas de proceder.

### **A) Productos reestructurados estabilizados por el calor**

Este procedimiento fue el utilizado inicialmente para la elaboración de productos cárnicos reestructurados. En este caso, es necesario realizar un tratamiento térmico para conseguir la gelificación de las proteínas miofibrilares, dado que es esta estructura la que proporciona finalmente consistencia al producto final. El proceso de elaboración se orienta por tanto a conseguir suficiente matriz miofibrilar para sustentar todo el sistema cárnico. Para ello, es frecuente mezclar carne reducida a pasta fina con porciones cárnicas de distinto tamaño. Los componentes de esta mezcla permiten, en el caso de la pasta fina, disponer de proteína miofibrilar y, en el caso de las porciones cárnicas, proporcionar la visión de la estructura cárnica requerida en un producto reestructurado. Se aconseja que en el conjunto se incluya alrededor de un 20 % de pasta fina, que ha de mezclarse con una solución salina (cloruro sódico, fosfatos y polifosfatos) para proporcionar la fuerza iónica requerida para la solubilización, al menos parcial, de las proteínas miofibrilares. Por ejemplo, un 0,75 % de NaCl y un 0,125 % de trifosfato sódico serían suficientes. A esta mezcla se adicionan las porciones cárnicas de distintos tamaños con las que se elaborará el producto reestructurado. También pueden adicionarse otros componentes, como aislados de soja, gluten de trigo, fécula de patata, (generalmente en cantidades inferiores al 3,5 %), para incrementar la consistencia final del producto tras el tratamiento culinario mediante procesos de cogelificación.

El producto reestructurado crudo tiene una consistencia muy frágil, recurriéndose a diversas artimañas tecnológicas (recubrimiento con películas consistentes, congelación, etc.) para conferirle mayor estabilidad, firmeza y facilitar su manipulación durante la comercialización. Como se ha mencionado, el tratamiento térmico (generalmente durante el proceso culinario) es el que proporciona consistencia a la pieza, al producirse la gelificación de la matriz proteica miofibrilar atrapando las porciones cárnicas, y reteniendo el agua y la grasa (Cambero y col., 1991; Boles y Shand, 1999; Saguer y col., 2007; Rodríguez y col., 2010).

## **B) Reestructuración en frío**

La escasa consistencia presentada por los productos reestructurados crudos hizo que se iniciara la utilización de compuestos capaces de unir porciones de carne sin necesidad de recurrir a un tratamiento térmico. Estos compuestos constituyen los denominados agentes de ligazón o cohesión en frío (*binding agents*), a veces también denominados gelificantes en frío. Se trata de sustancias o sistemas no cárnicos, de distinta naturaleza, que tienen en común la capacidad de interaccionar a temperatura ambiente con los componentes de la carne de forma estable. La forma de actuar varía de unos agentes a otros, unos gelifican atrapando las porciones cárnicas con mayor o menor participación de los componentes de la carne en la estructura del gel formado, mientras que otros promueven enlaces entre las superficies cárnicas en contacto, y en algunos casos, acaecen ambos fenómenos. No obstante, muchos mecanismos de ligazón en frío no están bien caracterizados, por lo que es necesario incrementar las investigaciones en este campo.

La reestructuración de productos cárnicos en frío, por tanto, no depende de la funcionalidad de las proteínas miofibrilares y el proceso de elaboración se simplifica considerablemente respecto al inicialmente aplicado. En este caso, no se requiere un grado de reducción de tamaño determinado, puede trabajarse con porciones cárnicas de distintas dimensiones y no es necesaria la adición de sales, permitiendo la elaboración de productos más cardiosaludables (Swales, 2001; MacGregor y De Wardener, 2002; Teucher y col., 2008). Es suficiente con proceder a la mezcla de las piezas cárnicas con el agente de ligazón elegido y realizar el conformado del conjunto, de acuerdo al tamaño y estructura comercial que se desee conferir al producto reestructurado, en moldes o bolsas plásticas cerradas a vacío. En estas estructuras se mantendrá el sistema cárnico durante el tiempo requerido (período de ligazón) para el establecimiento de interacciones y la consecución de su gelificación o cohesión. Un elemento crítico es la exclusión del aire de la mezcla cárnica durante esta etapa final para evitar la presencia de cavernas en el seno del producto reestructurado y asegurar la proximidad entre las superficies cárnicas a unir para facilitar la acción del agente de ligazón. No obstante, es necesario investigar en cada caso las condiciones óptimas de procesado (temperatura, tiempo de ligazón o reposo, condiciones del medio, etc.) para potenciar las interacciones entre el agente de ligazón y las superficies cárnicas y maximizar así la cohesión del producto final.

### **C) Etiquetado de los productos reestructurados**

La nueva legislación europea sobre la información alimentaria facilitada al consumidor (Reglamento UE nº 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo) establece que “los productos cárnicos, preparados de carne y productos de la pesca que puedan dar la impresión de que están hechos de una pieza entera de carne o pescado, pero que en realidad consisten de diferentes piezas combinadas mediante otros ingredientes, incluidos los aditivos alimentarios y las enzimas alimentarias, o por otros medios, llevarán la siguiente indicación: elaborado a partir de piezas de carne y elaborado a partir de piezas de pescado”, y al considerarlo como una mención obligatoria que acompaña a la denominación del alimento se colocará cerca de ésta en la “parte frontal” del envase.

### **1.4. AGENTES DE LIGAZÓN O COHESIÓN EN FRÍO**

La utilización de agentes de ligazón para la reestructuración de piezas cárnicas puede considerarse una tecnología emergente aún poco utilizada, pese a que su empleo para unir porciones cárnicas de pequeño tamaño ha sido satisfactorio (Lennon y col., 2010; Beltrán-Lugo y col., 2005; Cofrades y col., 2011). De conseguirse el mismo efecto en piezas grandes sería un procedimiento de considerable interés para el manejo de piezas deshuesadas con distintos fines en la industria cárnica.

Los mecanismos de interacción entre porciones cárnicas son sumamente complejos y aún no están totalmente aclarados. No obstante, se considera que el establecimiento de interacciones complejas proteína-proteína es la base de estos fenómenos (Feeney y Whitaker, 1987). Un parámetro importante para establecer la eficacia de un determinado sistema de cohesión en frío es la fuerza de ligazón, definida como aquella requerida por unidad de área de sección para separar los componentes integrantes.

El primer “agente de ligazón” utilizado para la reestructuración de productos cárnicos, fue el sistema de alginato-calcio (Megard, 1987). Los alginatos (copolímeros de ácido D-manurónico y de ácido L-gulurónico) forman geles en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . En este fenómeno, se observa la formación de una red molecular en “huevera” debido a la asociación de secuencias de poliuronatos por quelación de iones polivalentes (Glicksman, 1982). Estos geles no son termorreversibles e interaccionan, especialmente mediante fuerzas electrostáticas, con las proteínas de la carne (Hughes y col., 1980;

Means y col., 1987; Bernal y col., 1987). Se ha comprobado que la incorporación de estos agentes en productos cárnicos reestructurados (Trout, 1989; Ensor y col., 1990) proporciona cohesión y disminuye la retracción del colágeno tras el proceso culinario, lo que permite incrementar la presencia de tejido conjuntivo hasta un 5-10 % con buena aceptación sensorial. Hasta el momento, se ha recurrido, fundamentalmente, al uso de alginato sódico (E-401) en combinación con diversas fuentes y concentraciones de calcio. Los mejores resultados se han obtenido con las mezclas de 0,13 % carbonato cálcico + 0,7 % alginato sódico (E 401), 0,6 % lactato cálcico + 0,7 % alginato sódico y más recientemente con 1 % alginato sódico + 0,2 % carbonato o lactato cálcico encapsulado + 0,3 % 1,5-glucono- $\delta$ -lactona, que disminuye progresivamente el pH para asegurar la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  (Boles y Shand, 1998; 1999; Hall, 2001; Krause y col, 2002). Las experiencias de esta naturaleza se han realizado con carne, picada o troceada en pequeñas porciones, a la que se adiciona la mezcla de ligazón en polvo a una concentración no superior al 1,5 % (p/p).

En el trabajo experimental desarrollado durante esta tesis doctoral, se optó por la utilización de agentes de ligazón derivados de plasma sanguíneo de origen porcino por su proximidad al producto a tratar, y del sistema enzimático transglutaminasa, por su extensa aplicación en la industria cárnica para distintos fines. Son, pues, estos agentes los que se analizan en detalle seguidamente.

#### **I.4.1. TRANSGLUTAMINASA**

El término de transglutaminasa (TGasa) fue introducido por Clarke y col. (1959) para describir la transamidación observada en el hígado de cobaya. Más tarde, Pisano y col. (1968) realizaron estudios sobre la estabilización de los monómeros de fibrina durante la coagulación sanguínea y quedó demostrado que la transamidación estaba provocada por enzimas capaces de formar uniones entre proteínas mediante una reacción de acil-transferencia entre el grupo  $\gamma$ -carboxiamida de un péptido con un residuo de glutamina (acil dador) y el grupo  $\epsilon$ -amino de un péptido con un residuo de lisina (acil receptor), resultando una unión isopeptídica  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamin)-lisina (Folk y Finlayson, 1977; Folk, 1980), lo que llevó a pensar que la TGasa podía modificar el comportamiento de los sustratos proteicos (Whitaker, 1977).

Desde entonces, se ha encontrado una gran variedad de proteínas que presentan actividad TGasa. Se trata de tranferasas, las cuales tienen el nombre sistemático de proteína-glutamina  $\gamma$ -glutamiltransferasas (EC 2.3.2.13, Enzyme Nomenclature, 1992). Estas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, tanto en microorganismos (Kanaji y col., 1993; Cui y col., 2007), como en plantas (Del Duca y col., 1995; Icekson y Apelbaum, 1987), invertebrados (Singh y Mehta, 1994), anfibios (Zhang y Masui, 1997), peces (Yasueda y col., 1994), aves (Puszkín y Raghuraman, 1985), mamíferos (Hand y col., 1993) y en humanos (Aeschliman y Paulsson, 1994). Una de las TGasas más conocidas y estudiadas es el factor XIII de la sangre, que participa en el proceso de coagulación mediante la formación de enlaces entre las moléculas de fibrina y la estabilización de los polímeros resultantes.

### 1.4.1.1. ACTIVIDAD DE LAS TRANSGLUTAMINASAS (TGasas)

El papel fisiológico de las TGasas en los organismos es muy diverso; se considera que actúan como mediadores de “pegamentos” biológicos y estando implicadas, por ejemplo, en la coagulación sanguínea, la cicatrización de heridas, la queratinización de la epidermis, el engrosamiento de la membrana de los eritrocitos (Aeschliman y Paulsson, 1994) y la unión de cartílagos (Jürgensen y col., 1997). Asimismo, son particularmente notables como autoantígenos en la enfermedad celíaca (Dieterich y col., 1997) y por desempeñar un papel en la apoptosis (Fesus y col., 1996), diferenciación celular y la estabilización de la matriz extracelular (Griffin y col., 2002). Tanto su deficiencia (Gootenberg, 1998) como su sobreproducción se ha relacionado con distintas enfermedades como enfermedades neurodegenerativas (Lesort y col., 2000), cáncer (Birckbichler y col., 1977; Barnes y col., 1985; Kumar y Mehta, 2013), fibrosis pulmonar (Griffin y col., 1979) y otras como aterosclerosis, Alzheimer, anemia, artritis reumatoide, etc. (Wilhelm y col., 1996; Chen y Mehta, 1999; Kim y col., 2002).

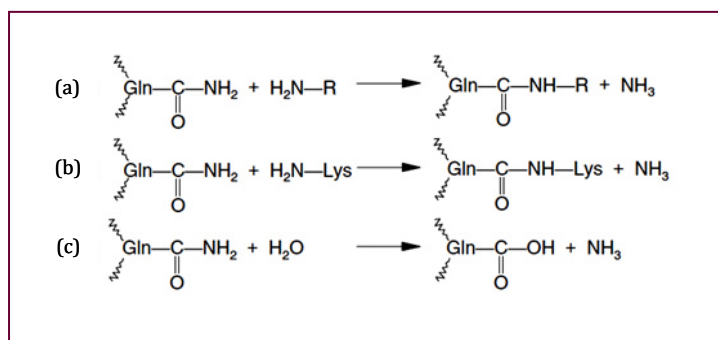
La posibilidad de utilizar enzimas para modificar las propiedades funcionales de los alimentos tiene un considerable interés debido a que el consumidor percibe las enzimas como “algo más natural que químico”. Desde el punto de vista de la Tecnología de Alimentos, el empleo de enzimas supone unas condiciones físico-químicas de trabajo menos extremas (pH, temperatura, etc.), presentan una elevada especificidad, se requieren cantidades catalíticas y la probabilidad de que generen sustancias tóxicas es mínima (Singh, 1991).

Las TGasas catalizan uniones intermoleculares de proteínas que afectan a las propiedades de las moléculas proteicas implicadas, como la capacidad de gelificación, la estabilidad térmica y la CRA (Kuraishi y col., 2001). Al igual que la acción de la TGasas endógena (de tejidos animales o vegetales), el calor induce la formación de enlaces  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamil)-lisina mediante la deshidratación química del grupo  $\gamma$ -carboxilo del glutamato y el grupo  $\epsilon$ - de la lisina (Asquith y col., 1974; Otterburn y col., 1977). Por este motivo, la cantidad de estos enlaces que aparecen en los alimentos cocinados o sometidos a tratamiento térmico es muy superior a los que se pueden encontrar en alimentos crudos (Sakamoto y col., 1995; Seguro y col., 1996a). Por otra parte, hay alimentos, como las huevas de algunos peces (salmón rojo, arenque, sardina o abadejo de Alaska), que presentan estos enlaces de forma natural (Kumazawa y col., 1996a). Por tanto, el ser humano ha estado ingiriendo desde hace muchos años alimentos en los que de forma natural se encuentran moléculas con este tipo de enlaces sin ninguna consecuencia nociva aparente para su salud, e incluso se ha sugerido (Seguro y col., 1995b; Seguro y col., 1996b) que, estos podrían ocasionar un aumento de la calidad nutritiva de los alimentos que los contienen.

#### I.4.1.2. MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS TGasas

Las TGasas catalizan la reacción de transferencia (Figura I.3.a) entre los grupos  $\gamma$ -carboxiamida de residuos de glutamina en proteínas, péptidos y en varias aminas primarias (Zhu y Tramper, 2008; Yokohama y col., 2004). Asimismo, cuando un grupo  $\epsilon$ -amino de lisina actúa como receptor de grupos acil, se produce una polimerización y un entrecruzamiento molecular de las proteínas mediante la formación de enlaces  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamil)-lisina (Figura I.3.b), rindiendo enlaces intra e intermoleculares (Motoki y Seguro, 1998). Esto ocurre a través del intercambio de los grupos  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina por amonio en el grupo carboxiamida del residuo de la glutamina en la molécula de proteína. En ausencia de aminas primarias, el agua puede actuar como aceptor de grupos acil, resultando en la desaminación (Figura I.3.c) de los grupos  $\gamma$ -carboxiamida de residuos de glutamina (Ando y col., 1989) para formar ácido glutámico.





**Figura I.3.** Reacción catalizada por las transglutaminasas (TGAsas): (a) reacción de acil-transferencia; (b) reacción de entrecruzamiento entre los residuos de Gln y Lys de proteínas o péptidos; (c) desaminación (Motoki y Seguro, 1998).

En definitiva, las TGAsas pueden modificar las proteínas mediante tres modalidades reactivas: acilación, generación de enlaces interaminoacídicos (glutamina-lisina) y desaminación. Estas reacciones pueden utilizarse para modificar las propiedades funcionales de alimentos y, de hecho, así se ha aplicado a proteínas de suero sanguíneo, de soja, del gluten, miosina y actomiosina. Este procedimiento permite obtener productos con una textura diferente a la que originalmente presentan, encapsular lípidos, formar películas resistentes al calor y minimizar la permeabilidad del agua, gelificar materiales sin necesidad de aplicar un tratamiento térmico, aumentar la elasticidad de productos y la CRA, modificar la solubilidad y las propiedades funcionales y producir proteínas alimentarias de mayor valor nutritivo mediante el entrecruzamiento de proteínas que contengan aminoácidos esenciales (Matheis y Whitaker, 1987; Motoki y Seguro, 1994; Kuraishi y col., 2000; Motoki y Kumazawa, 2000). Respecto a este último punto, el establecimiento de enlaces glutamina-lisina, permitiría proteger este último aminoácido frente a otras reacciones. Durante el proceso de digestión de los alimentos, las proteínas liberan aminoácidos, pero el dipéptido glutamina-lisina se mantiene intacto hasta que es absorbido a nivel intestinal y transportado al hígado donde, merced a la acción de enzimas específicas ( $\gamma$ -glutamylamina ciclotransferasa y  $\gamma$ -glutamyltransferasa), se degrada, quedando disponible para satisfacer los requerimientos nutricionales. A este respecto, Seguro y col. (1996a) realizaron experimentos de biodisponibilidad en ratas alimentadas con caseínas fuertemente ligadas demostrando que los enlaces  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)-lisina se metabolizan completamente y la lisina se incorpora a los tejidos.

Una característica común que presentan las TGasas de origen animal (por ejemplo, el factor XIII mencionado anteriormente) o vegetal es la dependencia de su actividad catalítica de la presencia del ión  $\text{Ca}^{2+}$  (Tokunaga y col., 1993). Además, las TGasas aisladas de la sangre requieren también trombina, por lo que generalmente en su extracción se obtiene un preparado de color rojo, lo que dificulta notablemente su aplicación en la industria alimentaria. Sin embargo, las TGasas de origen microbiano (MTGasas) son independientes del  $\text{Ca}^{2+}$  (Ando y col., 1989) y tampoco requieren trombina, lo que facilita su aplicación industrial. Esta circunstancia es especialmente importante para su utilización en Tecnología de Alimentos, dado que muchas proteínas tienden a precipitar cuando hay concentraciones relativamente bajas de calcio iónico en el medio, tal es el caso de la caseína. Las TGasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  necesitan incorporar el ión a la matriz porque éste induce un cambio conformacional en la molécula que conlleva la exposición de un residuo de cisteína en el dominio del sitio activo (Chen y Mehta, 1999). La cisteína reacciona con un residuo de glutamina del sustrato y forma el intermediario acil-enzima, liberando amoníaco y reaccionando después con una amina primaria para formar el enlace  $\gamma$ -glutamin-amino.

En general, las MTGasas, frente a las TGasas de otro origen, presentan considerables ventajas para su uso a nivel industrial, además de la ya mencionada actividad independiente del  $\text{Ca}^{2+}$ , como un menor peso molecular, elevada velocidad de reacción y actividad en un intervalo más amplio de pH y a temperaturas más bajas (Ikura, 1980; Kurth y Rogers, 1984; Motoki y Nio, 1983; Zhu y col., 1995).

#### **1.4.1.3. OBTENCIÓN DE TGasas**

Durante décadas la única TGasas que se comercializaba procedía del hígado de cobaya (Motoki y Nio, 1983, Nio y col., 1985) o de plasma de origen bovino (Kurth y Rogers, 1984) pero como su proceso de separación y purificación era muy tedioso y de bajo rendimiento, la enzima tenía un precio muy elevado (aproximadamente 80 dólares por unidad, [Zheng y col., 2002a]), lo que hacía inviable su uso a nivel industrial.

Desde 1960, varios autores (Brookhart y col., 1983; Ando y col., 1989) acometieron estudios para purificar, caracterizar y valorar la posibilidad de aplicar TGasas procedentes de microorganismos, plantas y animales terrestres y acuáticos utilizando diferentes estrategias, sin que se obtuviera un método rentable de producir esta

enzima. Cabe destacar las investigaciones realizadas por el grupo del Profesor Motoki (Motoki y col., 1983, 1984, 1986, 1987, 1998) llevadas a cabo desde tres frentes: a) extracción y purificación de la enzima a partir de los tejidos animales, b) obtención de la enzima mediante manipulación genética a partir de ciertos microorganismos, como *Escherichia coli*, *Bacillus* spp., levaduras, y *Aspergillus* spp., estrategia que ya estaban utilizando otros investigadores y c) producción industrial mediante fermentación convencional, lo que implicaba la búsqueda de un microorganismo que produjera cantidades razonables de TGasa. En 1989, en un estudio promovido por la empresa farmacéutica Amano Enzyme Co. (Nagoya, Japón) en el que se analizaron cerca de 5.000 microorganismos, Ando y col. (1989) descubrieron que *Streptoverticillium* S-8112 producía TGasa. En la misma época, Motoki y col. (1989) encontraron que distintas especies de *Streptomyces*, también sintetizaban esta enzima, lo que se confirmó años más tarde (Washizu y col., 1994). Posteriormente, Kanaji y col. (1993) revelaron la estructura primaria de la TGasa procedente de *Streptoverticillium* S-8112.

El descubrimiento de la producción de enzimas con actividad TGasa vía microbiana (MTGasa) mediante fermentaciones convencionales con *Streptomyces* sp. (Motoki y col., 1989) y *Streptoverticillium* sp. (Ando y col., 1989, 1992) permitió una producción económicamente rentable y supuso, por tanto, un gran avance para su empleo potencial en la industria cosmética y farmacéutica e incluso para tratamientos médicos. No obstante, no estuvo exento de polémica el empleo de enzimas de origen microbiano para esta última aplicación. La reorganización moderna de la taxonomía microbiana ha llegado a la conclusión que ambos géneros son idénticos aunque en esta memoria se empleará la denominación utilizada por los autores de los trabajos que se citen, o simplemente *Streptoverticillium* sp., que es el nombre que emplea la empresa suministradora de la enzima que se ha utilizado en la fase experimental de la presente tesis doctoral.

La primera empresa que comercializó la MTGasa para fines alimentarios fue Ajinomoto Co., Inc. (Tokio, Japón) con el nombre comercial de “ACTIVA® Transglutaminase”. En la actualidad, al menos dos empresas españolas (BDF Natural Ingredients y Proquiga, S.A.) comercializan MTGasa para el mismo uso. En el desarrollo de la presente tesis doctoral, como se indica en el capítulo de Material y Métodos, se ha utilizado la MTGasa comercializada por Ajinomoto Co., Inc. para productos cárnicos por ser la más utilizada en la industria alimentaria.

#### I.4.1.4. TRANSGLUTAMINASA DE ORIGEN MICROBIANO (MTGasa)

##### A) Aspectos relacionados con la producción de MTGasa

Junto a *S. cinnamoneum*, *S. mobaraense* es la especie más frecuentemente utilizada para la producción de MTGasa. Se trata de una bacteria filamentosa Gram-positiva cuyo nicho ecológico es el suelo y que presenta un ciclo de vida complejo que se caracteriza por al menos tres etapas diferenciadas. Su crecimiento en placa con un medio de cultivo que contenga glucosa, extracto de levadura y de malta conduce a la esporulación, mientras que en medio líquido no esporula (Zotzel y col., 2003).

El procedimiento de fermentación para la producción de MTGasa es similar al utilizado para la mayor parte de los microorganismos. Se emplea un medio de cultivo líquido rico en nutrientes que se mantiene en plena aerobiosis mediante agitación constante (250 rpm) y se incuba a 25 – 35 °C, durante 3 días (Aldo y col., 2002a Ando y col., 1989). Otros autores (Zheng y col., 2002a) han utilizado condiciones algo diferentes (400-500 rpm, 30 °C durante 55 horas), aunque la modificación más importante fue el control del pH (de 7 durante las primeras 13 horas y descendiénolo a 6,5 hasta el final del proceso) con lo que se obtenía un rendimiento de alrededor de un 25% más respecto a la fermentación a pH constante de 7,0.

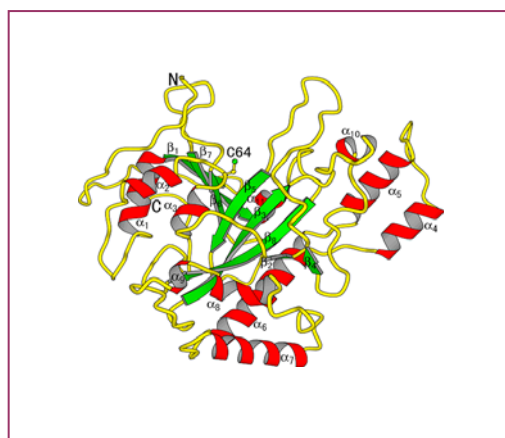
La MTGasa es una enzima extracelular, secretada como un zimógeno que se activa por un proceso proteolítico (Pasternack y col., 1998). Para su obtención masiva se recupera del sobrenadante del cultivo fermentado y se extrae y purifica por métodos convencionales, como diálisis, ultrafiltración o diversos métodos cromatográficos (intercambio iónico, adsorción, exclusión molecular, etc) o por combinación de algunos de los precedentes. En este contexto, y partiendo del procedimiento de obtención de MTGasa de Ando y col. (1989, 1992) y Motoki y col. (1989), Gerber y col. (1994) describieron un método más rápido y sencillo basado en la fermentación del microorganismo, posterior centrifugación y finalmente purificación de la MGTasa por cromatografía de intercambio iónico.

Hace una década se aisló otra bacteria, *Corynebacterium glutamicum*, que sintetizaba también MTGsa (Kikuchi y col., 2003; Date y col., 2003). Su elevado rendimiento y el conocimiento que se tiene de su genoma, convierten a esta bacteria en un candidato muy propicio para la producción de MTGasa a nivel industrial destinada a la elaboración de alimentos.

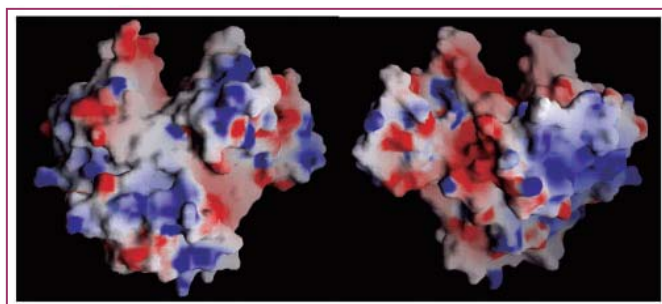
## B) Aspectos relacionados con la estructura molecular de la MTGasa

El peso molecular de la enzima se ha establecido alrededor de 38 kDa (Washizu y col., 1994; Kanaji y col., 1993) y 40 kDa (Ando y col., 1989) y su estructura primaria, desvelada mediante secuenciación proteica, está constituida por una cadena de 331 residuos aminoacídicos (Kanaji y col., 1993), lo que implica un valor próximo a la mitad del peso molecular del factor XIII (75-80 kDa) y de la TGasa obtenida de plasma sanguíneo de origen porcino (Tseng y col., 1999). Una de las diferencias más destacadas entre la TGasa de origen animal y la MTGasa es el punto isoeléctrico que se sitúa en 4,5 en la primera (en el caso de la procedente de hígado de cerdo) y 8,9 en la segunda.

La estructura cristalina de la MTGasa fue determinada por Kashiwagi y col. (2002) mediante cristalografía de rayos X, a una resolución de 0,24 nm. La MTGasa consta de un dominio compacto y único, de dimensiones  $6,5 \times 5,9 \times 4,1 = 157 \text{ nm}^3$  que al plegarse (tipo  $\alpha+\beta$ , con 11  $\alpha$ -hélices y 8  $\beta$ -láminas) recuerda a una lámina con una profunda hendidura de 1,6 nm en el extremo superior de la molécula (Figura I.4). El residuo esencial para la actividad catalítica de la enzima, Cys<sup>64</sup> se localiza en la parte inferior de la hendidura y cercano a él se halla el extremo N-terminal de la cadena polipeptídica (Kashiwagi y col., 2002). Las  $\alpha$ -hélices y las  $\beta$ -láminas se sitúan principalmente en los grupos amino y carboxilo terminales del polipéptido, respectivamente, con una disposición tal que cada  $\beta$ -lámina está rodeada por  $\alpha$ -hélices, originando una estructura secundaria única con tres regiones diferenciadas (Figura I.4).



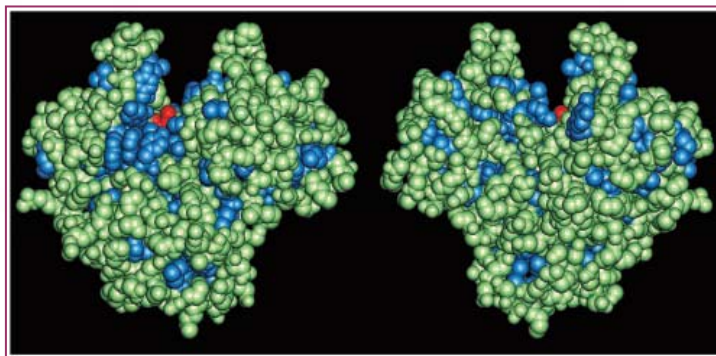
El análisis de la superficie de las MTGasas muestra que las cargas negativas se sitúan mayoritariamente en el sitio activo, mientras que la superficie de la molécula se encuentra cubierta principalmente de cargas positivas (Figura I.5). Además hay una gran cantidad de residuos ácidos en el sitio activo de la enzima, e hidrofóbicos y aromáticos en la superficie que rodea al mismo (Figura I.6), lo que se cree que está relacionado con la especificidad de la enzima (Kashiwagi y col., 2002).



**Figura I.5.** Superficie electrostática de la MTGasa. Vistas de ambas caras de una molécula de MTGasa. La superficie está coloreada desde el rojo al azul en el intervalo de  $-10,0$  a  $10,0 K_B T$ , donde  $K_B$  es la constante de Boltzmann y  $T$  es la temperatura absoluta (Kashiwagi y col., 2002).

La comparación de la estructura de las TGasas (Yee y col., 1994) procedentes de algunos tejidos animales (por ejemplo el factor XIII) y la MTGasa (Noguchi y col., 2001; Yokoyama y col., 2004) indica que la organización del sitio activo es bastante similar, al igual que la disposición de las estructuras secundarias en su entorno. Sin embargo, la diferencia más notable está en la carencia de la triada catalítica Cys-His-Asp, que caracteriza a las MTGasas (Kashiwagi y col., 2002). La similitud de la estructura del sitio activo, a pesar de las diferencias en la estructura global de la MTGasa y otras TGasas (factor XIII), sugiere que estas enzimas representan un caso especial de evolución molecular convergente. Lo que resulta en que la MTGasa haya desarrollado un mecanismo catalítico único especializado para reacciones de ligazón (Yokoyama y col., 2004; Ohtsuka y col., 2001).

El pH afecta a la actividad enzimática al cambiar el estado de ionización del sitio activo de la enzima y modificar la distribución iónica del sustrato (Yeh, 2000).



**Figura I.6.** Modelo de van Der Waals de la MTGasa. Vistas de ambas caras de una molécula de MTGasa. Los residuos aromáticos e hidrofóbicos están coloreados en azul (Phe, Tyr, Trp, Val, Ile, Leu y Met), Cys<sup>64</sup> en rojo y otros residuos en color verde (Kashiwagi y col., 2002).

### C) Aspectos relacionados con la actividad de la MTGasa

Las condiciones más idóneas para el desarrollo de la actividad de la MTGasa son una temperatura de 37 °C y un pH entre 5 y 9, aunque Ando y col. (1989) acotaron más este intervalo, estableciéndolo entre 6 y 7. No obstante, desde el punto de vista de su aplicación en alimentos es de gran importancia tener presente la actividad enzimática de la MTGasa a valores de pH ácido, ya que el valor normal de este factor en la gran mayoría de los alimentos (fundamentalmente en los de origen animal) es inferior a 6 – 6,5 (Seguro y col., 1996b; Ando y col., 1989). Por otra parte, se ha observado que una temperatura de 70 °C durante pocos minutos produce la pérdida de actividad MTGasa. Sin embargo, la enzima conserva cierta actividad a 0 °C (Ando y col., 1989; Zheng y col. 2002a).

La actividad de las MTGasas puede inhibirse cuando no existan en el medio agentes reductores, y por la presencia de metales pesados como Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> y Pb<sup>2+</sup>. Estos últimos pueden ligarse al grupo tiol del resto de cisteína que, como se ha mencionado anteriormente, es el aminoácido fundamental del sitio activo (Seguro y col., 1996b). Otros autores (Ando y col., 1989; Tsai y col., 2006) comprobaron el mismo efecto con otros compuestos con la facultad de unirse a grupos tiol (ácido p-cloro-mercuribenzoico, N-etilmaleimida o mono-yodo-acetato).

Nio y col. (1985) fueron pioneros en el intento de producir la gelificación de proteínas en alimentos mediante el uso de MTGasa. Se ha demostrado que esta enzima



produce la gelificación de soluciones concentradas de proteínas de soja, leche, miosina y en general de carne de ternera, cerdo, pollo y pescado (Kang y col., 1994; Nielsen, 1995; Nonaka y col., 1992 y 1997; Seguro, 1995a; Zhu y col., 1995) de forma similar a como se realiza con la enzima procedente de tejidos animales. Dependiendo del tipo de proteína que se trate, las condiciones de gelificación pueden variar; por ejemplo, si se utiliza proteína de soja y se calienta a 100 °C durante un tiempo de 15 minutos, la gelificación de las globulinas de soja origina una textura endurecida con nuevas propiedades. Las caseínas gelifican con MTGasa sin necesidad de tratamientos adicionales. También se han obtenido geles termo-irreversibles a partir de gelatina (Kato y col., 1991).

Parece lógico pensar que la actividad catalítica de las MTGasas depende de la disposición estructural de la proteína que actúa como sustrato. En este sentido, los residuos reactivos de la glutamina se encuentran en las regiones flexibles de las cadenas polipeptídicas (o con plegamiento giro  $\beta$  o inverso). El entrecruzamiento y la formación de la red proteica resultan más eficientes cuando el residuo de glutamina del sustrato se halla en alguna de ambas regiones. Por esta razón, las caseínas son un buen sustrato mientras que las proteínas globulares (por ejemplo, la ovoalbúmina y la  $\beta$ -lactoglobulina) son peores. Hay otros agentes/factores que favorecen también la actividad catalítica de la enzima. Entre ellos puede mencionarse la temperatura, los iones  $\text{Ca}^{2+}$  y el pH (Larre y col., 1992), la ruptura de enlaces -S-S- (Aboumahmoud y Savello, 1990) y la adsorción en una interfase aceite/agua (Færgemand y col., 1997).

#### **D) Aspectos relacionados con la estimación de la actividad enzimática de las MTGasas**

La actividad enzimática de la MTGasa, y en general de las TGasas, puede estimarse colorimétricamente mediante el procedimiento descrito por Grossowicz y col. (1950) en el que se utiliza como sustrato N-carbobenzoxi-L-glutaminil-glicina (Z-Gln-Gly). La curva patrón se realiza utilizando ácido L-glutámico  $\gamma$ -monohidroxamato. La unidad de actividad enzimática (U) de TGasa se define como la cantidad necesaria para catalizar la formación de un  $\mu\text{mol}$  de ácido L-glutámico  $\gamma$ -monohidroxamato por minuto a 37 °C a un determinado pH (Ando y col., 1989; Zheng y col. 2002a). Los preparados comerciales habitualmente utilizados en la industria alimentaria presentan una actividad MTGasa comprendida entre 34 y 65 U/g.



### 1.4.1.5. ASPECTOS LEGALES RELACIONADOS CON EL USO DE TGasas

Actualmente, en la UE el empleo de enzimas para la elaboración de alimentos se rige por el Reglamento 1332/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre enzimas alimentarias y por el que se modifican la Directiva 83/417/CEE del Consejo, el Reglamento (CE) n° 1493/1999 del Consejo, la Directiva 2000/13/CE, la Directiva 2001/112/CE del Consejo y el Reglamento (CE) n° 258/97. Este Reglamento es de aplicación para enzimas utilizadas con fines tecnológicos en la fabricación, transformación, preparación, tratamiento, envasado, transporte o almacenamiento de alimentos. Algunos países de la UE, como Francia, tienen una normativa específica para enzimas alimentarias e incluyen la aprobación de esta enzima, como coadyuvante tecnológico, en la preparación de diversos alimentos.

Respecto al etiquetado de los productos en los que se adiciona esta enzima, al ser considerada como un coadyuvante tecnológico, no es necesario que se incluya en el listado de ingredientes (Reglamento (CE) N° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008 sobre aditivos alimentarios). En todo caso, en el producto final, la TGasas estará inactivada como consecuencia del tratamiento térmico durante la elaboración del producto (pasteurización, esterilización, etc.) o del proceso culinario. La actividad enzimática también puede inactivarse por agotamiento de la misma y/o del sustrato sobre el que actúa durante el proceso de producción y almacenamiento del producto.

Por otra parte, el reconocimiento de la MTGasas como ingrediente GRAS (Generally Recognized As Safe, “Generalmente reconocida como segura”) en 2001 (FDA, 2013) por un grupo de científicos expertos, ha contribuido, sin duda, a su amplia utilización en la industria alimentaria. Este hecho, y su capacidad para modificar las propiedades funcionales de un amplio abanico de proteínas, hace suponer que su empleo se incrementará en los próximos años, especialmente como agente de gelificación y ligazón en frío (Kuraishi y col., 2001). En países, como EE. UU., Canadá, Brasil, Japón, Corea, China y Tailandia, al igual que en el caso de los estados miembros de la EU, está autorizado el empleo de la TGasas para la elaboración de alimentos de distinta naturaleza. En 1998, el USDA (United States Department of Agriculture) ha aprobado el uso de hasta 65 ppm de MTGasas para elaborar productos cárnicos y derivados bajos en grasa y sal (Luciano y Arntfield, 2012; Torné y col., 2007) y de hasta 25 ppm para obtener reestructurados o análogos de carne (Goodman y col., 1998).

#### **I.4.1.6. PRINCIPALES APLICACIONES DE LAS TGasas EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA**

El empleo de MTGasa, y en general de TGasas, es una herramienta de gran potencial para crear nuevas texturas y elaborar nuevos productos. Cabe añadir la posibilidad de incrementar la calidad nutricional de distintos preparados para asegurar el aporte de algunos aminoácidos esenciales como la lisina (Zhu y col., 1995).

Son muchos los ejemplos que pueden ofrecerse acerca de las ventajas de la aplicación de estas enzimas en la industria alimentaria. Una de las características de la MTGasa es, como se ha mencionado, su capacidad de ligar proteínas de distinto origen. Así por ejemplo, es posible establecer interacciones entre caseína y gelatina para obtener nuevas proteínas con una elevada solubilidad a pH ácido (Kato y col., 1991). Además la MTGasa permite la obtención de geles a partir de proteínas que no gelifican de forma natural y aporta más estabilidad a los habitualmente obtenidos por calentamiento o enfriamiento de distintos preparados proteicos (Motoki y col. 1994, Kanegae y col., 1993; Tani y col., 1991).

Nielsen (1995) utilizó TGasas para elaborar productos, como salami o yogur, bajos en grasa, utilizando la MTGasa para proporcionar una textura y palatabilidad similar a la aportada por la grasa. Kuraishi y col. (1997) estudiaron la elaboración de productos cárnicos reestructurados mediante el empleo de MTGasa. Estos autores observaron que el uso de la enzima junto con caseinatos proporcionaba a la mezcla cárnica una viscosidad que favorecía las interacciones entre las piezas de carne y que la adición de fosfatos potenciaba la cohesión desarrollada por la MTGasa. Estos autores también comprobaron la posibilidad de elaborar productos bajos en grasa y sal mediante el uso de esta enzima. Asimismo, Kuraishi y col. (2001) observaron que la fuerza de ligazón desarrollada en los productos cárnicos reestructurados con MTGasa permite su loncheado, congelación y elaboración culinaria. Estos autores también realizaron un amplio estudio de las posibles aplicaciones de esta enzima en otros alimentos, tales como derivados de la pesca, productos cárnicos, pastas alimenticias, productos lácteos, productos a base de soja, etc. (Kuraishi y col., 2001).

La MTGasa también se utiliza en la industria de la panadería para mejorar las propiedades de la masa panaria durante los procesos de congelación/descongelación (Kirk y col., 2002). Algunos autores consideran que su incorporación puede reducir la actividad alergénica de los ingredientes de la harina de trigo (Gianfrani y col., 2007). No

obstante, este es un tema controvertido dado que, por un lado, la TGasa endógena está asociada a la enfermedad celíaca (Gerrard y Sutton, 2005) y por otro, se afirma que la MTGasa, combinada con el éster metílico de lisina, es capaz de inhibir la respuesta intestinal que origina esta enfermedad (Gianfrani y col., 2007). Estas afirmaciones contradictorias pueden deberse a las diferencias en las propiedades bioquímicas de ambas TGasas. No obstante, ésta es una línea de investigación de indudable interés científico y aplicado.

Las MTGasas, también se han utilizado en el envasado de alimentos, en concreto para la obtención de películas y revestimientos comestibles. Como ejemplo, puede mencionarse el trabajo pionero en este campo de Takagaki y col. (1991). Estos autores, elaboraron películas a partir de gelatina y distintas proteínas gelificadas con MTGasa a las que adicionaron un agente bactericida natural para conservar frutas y verduras.

Uno de los campos donde el uso de MTGasa ha obtenido resultados más satisfactorios y con mayor valor añadido ha sido en el de la reestructuración de productos cárnicos y de pescado. Esta metodología se ha desarrollado rápidamente con muy buenas expectativas de mercado. En este campo se encuentran bastantes referencias en la bibliografía (Carballo y col., 2006; Serrano y col., 2004; Luciano y Arntfield, 2012). La MTGasa permite la unión o cohesión de porciones cárnicas (de mayor o menor tamaño) en frío, obteniéndose análogos de cortes anatómicos de excelentes características organolépticas con buena aceptación en el mercado (Sakamoto y Soeda, 1991). Resultados igualmente satisfactorios se han obtenido en la reestructuración de productos elaborados a partir de pescado (Téllez-Luis y col., 2002; Moreno y col., 2008; Suklim y col., 2004). Cabe señalar que esta aplicación permite elaborar productos de pescado exentos de espinas.

La MTGasa también se está utilizando en la industria cárnica para mejorar las características de textura (elasticidad, dureza, etc.) de productos cárnicos cocidos, como salchichas y jamón curado, al mismo tiempo que incrementan su firmeza permitiendo por ejemplo un loncheado más fino (Kuraishi y col. 2001).

El empleo de la MTGasa en diferentes tipos de productos es un claro indicador de su versatilidad y potencial tecnológico.

#### **I.4.1.7. APLICACIONES DE LAS TGasas EN LA INDUSTRIA NO ALIMENTARIA**

El uso de TGasas, incluida la MTGasa, no se limita a la industria alimentaria, ya que están surgiendo espacios de aplicación muy diversos, y en especial relacionados con la ingeniería de materiales y biomateriales. A este respecto hay una importante línea de investigación en el campo médico para el desarrollo de tejidos más resistentes y compatibles (Chau y col. 2005). Broderick y col. (2005) y Barbetta y col. (2006) han estudiado las propiedades mecánicas y las uniones formadas en la polimerización de la gelatina, y han obtenido resultados esperanzadores relacionados con la citocompatibilidad y reducción de citotoxicidad para aquellas gelatinas elaboradas con MTGasa.

Por otra parte, en la industria textil, el empleo TGasas está centrado en el tratamiento de lana. Este tejido se suele tratar habitualmente con proteasas para mejorar sus propiedades de manejo y reducir su tendencia a encoger, aunque el control de la proteólisis es complicado y una excesiva hidrólisis produce pérdida de peso y fuerza en la lana (justo el efecto contrario al buscado). Sin embargo, cuando la lana se trata con MTGasa o con TGasa de hígado de cobaya, la resistencia de la tela aumenta hasta un 25% y se minimiza la retracción (Cortez y col., 2004).

En la industria del cuero, las mezclas de gelatina o caseínas con MTGasa constituyen elementos de relleno para cubrir irregularidades con sustanciales ventajas frente a los materiales habitualmente empleados (como glucosa, harina y goma) (Taylor y col. 2006).

#### **I.4.2. AGENTES DE LIGAZÓN DERIVADOS DEL PLASMA SANGUÍNEO**

Para contextualizar el análisis de este punto, seguidamente se detallan algunos aspectos relacionados con el aprovechamiento de la sangre en matadero para la obtención de productos y derivados de elevado valor añadido.

### 1.4.2.1. CARACTERÍSTICAS, OBTENCIÓN Y APROVECHAMIENTO DE LA SANGRE EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

La sangre se considera un subproducto cárnico, entendiendo como tal toda materia prima que se obtiene de los animales de abasto y que no está comprendida en el concepto de canal o despojo (Ockerman, 2000). La sangre es un tejido rico en hierro, con un importante aporte de proteínas de considerable interés nutricional, funcional y tecnológico (Costafreda, 1996). En virtud de estas características, no puede desdeñarse su aprovechamiento en la industria alimentaria. Sin embargo, su revalorización implica realizar una recogida bajo estrictas condiciones higiénicas (Real Decreto 640/2006, de 26 de mayo, por el que se regulan determinadas condiciones de aplicación de las disposiciones comunitarias en materia de higiene, de la producción y comercialización de los productos alimenticios; Reglamento 853/2004, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal ); de no efectuarse así, la sangre generada debe considerarse y tratarse como un residuo industrial (Real Decreto 1528/2012, de 8 de noviembre, por el que se establecen las normas aplicables a los subproductos animales y los productos derivados no destinados al consumo humano). El aprovechamiento de la sangre en los mataderos permite controlar el impacto medioambiental de su eliminación, a la vez que se obtienen derivados de elevado valor añadido. No debe olvidarse que la sangre es uno de los residuos de mayor poder contaminante que genera la industria cárnica, con una demanda química de oxígeno (DQO) de aproximadamente 375.000 mg/L (Tritt y Schuchardt, 1992). Su elevada carga orgánica obliga a tratarla antes de verterse a los medios acuáticos naturales, lo que supone disponer, en los propios mataderos, de infraestructuras específicas que requieren importantes inversiones y costes. En la actualidad existen empresas especializadas para la recogida de sangre de mataderos y su transformación en harina y otros derivados comerciales con muy variados destinos, como la alimentación animal, obtención de abonos, cosmética, industria farmacéutica, etc.

La mejora de las técnicas de procesado de la sangre en el sector alimentario ha favorecido el desarrollo de una gran variedad de productos e ingredientes (especialmente derivados proteicos) con un mercado floreciente para la elaboración de múltiples productos, entre los que se encuentran los suplementos dietéticos que satisfacen necesidades nutricionales específicas (Ockerman, 2000). El valor comercial de estos derivados supone un importante incentivo para países con elevada

producción de sangre. Tal es el caso de China, donde se generan anualmente alrededor de un 1.500.000 Tm de sangre de porcino, lo que supone una disposición de proteína similar a la que aportaría la misma cantidad de carne y huevo (Wang y col., 2007). En España, se estima una producción anual de sangre del mismo origen de 185.000 Tm. En general, se estima que sólo un 30% de la sangre recogida en mataderos se procesa para su uso en la industria alimentaria (Gatnau y col., 2001).

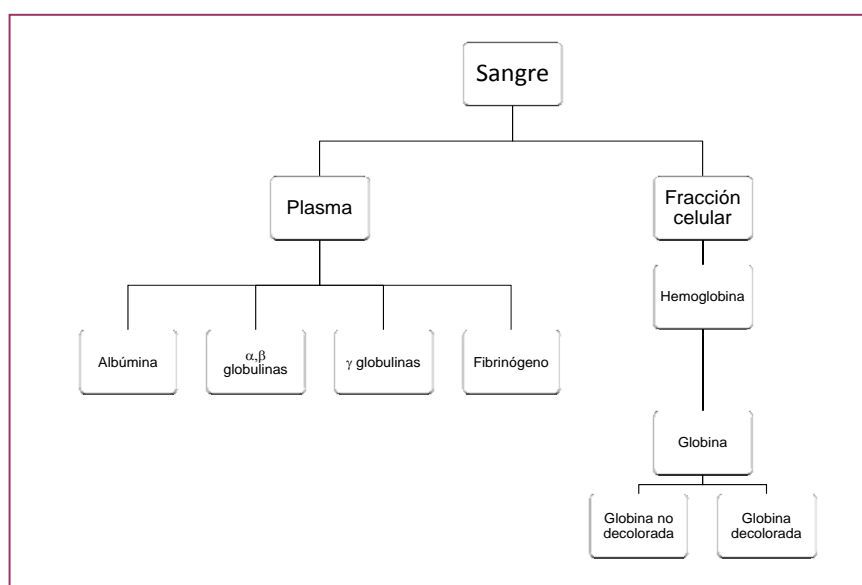
En un animal de abasto, como el ganado porcino, el contenido de sangre es aproximadamente el 6 % del peso vivo (normalmente se extrae para su aprovechamiento menos del 4 %). Teniendo en cuenta un peso medio de sacrificio de 90 kg, la cantidad de sangre obtenida por animal sería de 2,7 – 3,6 kg (Wanasundara y col., 2003), con un contenido de proteína de alrededor del 18 %. Si la sangre procedente de los 36 millones de cerdos sacrificados anualmente en España (FAO, 2011), y asumiendo que en torno a un 50 % se destinara a la alimentación humana, supondría disponer de más de 15.000 Tm de proteínas.

#### **a) Composición de la sangre**

Con pequeñas diferencias entre los diferentes animales de abasto (dependiendo, fundamentalmente, de la especie, raza, edad, estado fisiológico y alimentación), la sangre se compone de un 80% de agua y un 20% de sólidos, de los cuales, la mayor parte son proteínas (17-18,5 %) y el resto corresponde a grasa (0,23%), hidratos de carbono (0,07%) y minerales (0,62%) (Tybor y col., 1975; Ockerman, 2000). Debido a su riqueza en proteína, la sangre se ha denominado a veces como “carne líquida” o “proteína líquida” (Ockerman, 2000).

La sangre presenta dos fracciones (Figura I.7): el plasma (fracción soluble) y la porción celular (fracción insoluble). Para separar ambos componentes, la sangre, previa adición de un anticoagulante (ácido cítrico, citrato sódico, polifosfatos, etc.), se centrifuga (Álvarez y col., 2009). El plasma constituye del 60 al 70 % de la sangre (Ockerman y Hansen, 1994); es un fluido claro y algo amarillento que contiene alrededor de un 91 % de agua, entre un 6 y 8 % de proteínas y otras sustancias solubles (1-2 %). Entre las proteínas presentes en el plasma (Tabla I.4) se encuentran albúmina (3,3 %), inmunoglobulinas,  $\alpha$ - y  $\beta$ - globulinas (4,2 %), trombina, fibrinógeno (0,4 %), factores de crecimiento y lipoproteínas (Howell y Lawrie, 1983; Ockerman, 1994).

La fracción celular (parte hemo) es de color rojo, debido a que contiene los eritrocitos, además de los otros elementos formes como plaquetas y leucocitos. Está constituida por agua (62 %), proteínas (28-38 %) y sustancias sólidas (1-3 %) (Ockerman y Hansen, 1994). El 90 % de la proteína de esta fracción es hemoglobina (Wisner-Pedersen, 1988) que, a su vez, contiene un 9 % de hierro (Ranken, 1980).



**Figura I.7.** Fracciones y componentes de la sangre. Adaptado de Álvarez y col. (2009).

Si la sangre no se trata con anticoagulante y se deja reposar, se produce la separación en un coágulo organizado (con el componente celular) y el suero, que es equivalente al plasma pero sin la presencia de fibrinógeno y factores de coagulación (Tabla I.4). El suero sanguíneo puede obtenerse de forma controlada desfibrinando la sangre, es decir, forzando su coagulación mediante agitación. De esta forma, surgen grandes coágulos, que se separan fácilmente mediante filtrado y posterior centrifugación (Prandl y col., 1994).

### **b) Recogida y procesado de la sangre**

En los mataderos se distinguen dos tipos de sangre dependiendo de las condiciones de recogida:

- Obtenida por degüello, sin tomar medidas especiales para evitar la contaminación por microorganismos y sustancias extrañas. Esta sangre se utiliza

para fines industriales y alimentación animal (Real Decreto 1528/2012 de 8 de noviembre, por el que se establecen las normas aplicables a los subproductos animales y los productos derivados no destinados al consumo humano).

- Recogida guardando estrictas prácticas higiénicas para evitar la contaminación por cualquier material o sustancias (denominada sangre higiénica o “limpia”). Presenta las características requeridas para su uso en la industria alimentaria (Reglamento 853/2004, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal).

	<b>Sangre (S)</b> (Entera)	<b>Suero</b> (66 % de S)	<b>Plasma</b> (60 % de S)	<b>Fracción celular</b> (40 % de S)
<b>Agua</b>	80,8	91,2	90,8	60,8
<b>Sales minerales</b>	0,9	0,8	0,8	1,1
<b>Grasas</b>	0,2	0,1	0,1	0,4
<b>Proteínas</b>	17	7,5	7,9	35,1
Albúmina	2,2	3,3	3,3	
Fibrinógeno	0,3		0,4	
Globulina	2,8	4,2	4,2	
Hemoglobina	10			30
<b>Otras sustancias</b>	1	0,4	0,4	2,6

**Tabla I.4.** Composición (%) de las diferentes fracciones de la sangre de porcino (Ranken, 1980).

El método más adecuado para la recogida de sangre higiénica es la extracción automática en un sistema cerrado, que minimiza la contaminación de la sangre y extrae aproximadamente un 50 % del volumen (“primera sangre”). Existen varios diseños para ello (Sjöberg, 1990), que básicamente están constituidos por un cuchillo trocar o cánula hueca, que se introduce en el animal y que está conectado a través de un conducto flexible a un tanque y a una bomba de vacío que succiona la sangre. El sistema está provisto de un dosificador de solución anticoagulante (citrato sódico al 1% p/v), un filtro y un intercambiador de calor (generalmente de placas) para enfriar la sangre hasta 4-8 °C. Finalmente, se conduce a un tanque de almacenamiento refrigerado (Wisner-Pedersen, 1988; Madrid, 1999; Álvarez y col., 2009) para su conservación hasta su uso.



Puesto que muchos mataderos no están provistos de estas instalaciones, la recogida de la sangre se realiza en sistema abierto. En estos casos, para que la sangre sea higiénica, se utiliza una vía limpia y separada por donde fluye la sangre que proviene directamente del animal. En su recorrido se impide la coagulación de la sangre adicionando inhibidores (citrato sódico, polifosfatos, etc.). Al igual que en el sistema cerrado, la sangre finalmente se almacena en refrigeración (Madrid, 1999).

El sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC) es una herramienta útil para mejorar la calidad higiénico-sanitaria (Ramos-Clamont y col., 2003) de este subproducto. La comprobación de la calidad de la sangre obtenida se efectúa mediante al menos las siguientes acciones:

- Control visual del volumen extraído automáticamente.
- Controles microbiológicos de contaminación efectuados periódicamente. Se analizan dos parámetros: microbiota aerobia mesófila y enterobacterias totales. En caso de superación de los recuentos reglamentados se procede a deshechar el producto.
- Revisión sistemática del equipo de extracción tras la limpieza y desinfección diarias.

Como se ha mencionado, cuando se desea obtener el plasma sanguíneo y el componente celular, la sangre tratada con anticoagulante se centrifuga generalmente a 4-10 °C durante 10 minutos y al menos a 3.000 rpm (Howell y Lawrie, 1983). El plasma puede mantenerse en refrigeración (generalmente a 2 °C), congelarse o deshidratarse para su conservación hasta su empleo (fundamentalmente, adición a distintos productos o elaboración de harina) (Madrid, 1999; Wanasundara y col., 2003). Esta fracción también puede utilizarse para el aislamiento y purificación de sus proteínas, que se utilizan con distintos fines. El componente celular habitualmente se destina a la elaboración de morcillas y otros productos. Esta fracción, al igual que la sangre entera, también puede deshidratarse para obtener harinas de sangre (Madrid, 1999; Wanasundara y col., 2003).

### **c) Fraccionamiento del plasma sanguíneo**

El plasma sanguíneo de mamíferos es un fluido complejo en correspondencia con sus múltiples funciones biológicas (medio de distribución y transporte de nutrientes y metabolitos, medio regulador, etc.). Sus componentes, muchos de ellos proteínas,

responden a tareas tan dispares, como el desarrollo inmunológico y el proceso de coagulación sanguínea, entre otras. Las proteínas del plasma presentan propiedades funcionales de gran interés para diversos sectores industriales (farmacéutico, cosmética y alimentario) y en algunos casos se requiere su aislamiento y purificación para un uso concreto.

La albúmina tiene un peso molecular de 66-69 kDa; se trata de una proteína constituida por una cadena polipeptídica única de 582 aminoácidos (Cheftel, 1989). Adopta una estructura tridimensional globular que se compone de tres dominios homogéneos (I, II y III) predominantemente helicoidales, unidos por 17 puentes disulfuro y contiene, en el residuo aminoacídico 34, un grupo -SH libre. Se caracteriza por un bajo contenido en triptófano y metionina, un elevado contenido en cisteína y aminoácidos ácidos (aspártico y glutámico) y básicos (lisina y arginina). Es la proteína del plasma más estable, con un punto isoelectrico de 4,9 (Gras, 1956). Se sintetiza en el hígado y su principal función es el transporte de pequeñas moléculas orgánicas y de minerales, que se fijan de forma no específica por enlaces no covalentes, resultando en uniones reversibles (Cheftel, 1989).

Las globulinas constituyen una fracción muy heterogénea que incluye enzimas, proteínas transportadoras, anticuerpos, etc. Estas proteínas se subdividen en tres grupos:  $\alpha$ -globulinas (por ejemplo, la protrombina),  $\beta$ -globulinas (como las transferrinas) y  $\gamma$ -globulinas o inmunoglobulinas (A, G y M, las más abundantes y las minoritarias D y E). La mayoría presentan pesos moleculares entre 150 y 190 kDa. Las globulinas  $\alpha$  y  $\beta$  están constituidas por glicoproteínas y lipoproteínas, siendo proteínas químicamente homogéneas. Estas proteínas presentan puntos isoelectricos comprendidos entre 4,9 y 6,3, mientras que en las  $\gamma$ -globulinas oscilan entre 6,3 y 7,6 (Gras, 1956).

El fibrinógeno es la proteína que participa activamente en la coagulación de la sangre y presenta, como más adelante se detalla, una estructura fibrilar multidominio.

Como una práctica habitual, el plasma sanguíneo se somete a una centrifugación (10.000 rpm) para retirar la fracción grasa, que puede interferir en el proceso de fraccionamiento de sus proteínas y reducir su aprovechamiento (Prandl y col., 1994). Seguidamente, se procede a eliminar los componentes minerales, entre los que se encuentran varios cationes (calcio, potasio, magnesio, hierro, cobre y sodio) y aniones (cloruros, carbonatos, fosfatos, sulfatos, bromuros, yoduros y fluoruros). Esta etapa es

especialmente importante si se desea obtener proteínas para distintos usos, dado que los iones pueden interferir en la capacidad funcional de las mismas (Fernández y Díaz, 1995). Para este fin, pueden utilizarse varios procedimientos, como la cromatografía de intercambio iónico y la ultrafiltración (Goldsmith y De Filippi, 1971; Moure y col., 2007; Del Hoyo, 2007). También, puede tratarse por ósmosis inversa aunque, en este caso, la calidad del producto que se obtiene es inferior. La desmineralización del plasma optimiza además su procesamiento posterior; no obstante, en la bibliografía se encuentra cierta discrepancia, ya que algunos autores (Moure y col., 2007) indican que puede modificar la conformación nativa de las proteínas.

Existen distintos procedimientos para el fraccionamiento del componente proteico del plasma. Así, la adición paulatina de sulfato amónico conduce a la precipitación de las distintas moléculas proteicas en solución en función de sus características de solubilidad diferencial en medios con distintas concentraciones de esta sal (Spadaro y col., 2003). Este procedimiento permite clasificar las proteínas del plasma sanguíneo en dos grandes fracciones:

- Globulinas: fracción precipitada por semisaturación (alrededor del 50%) con sulfato amónico.
- Albúmina: fracción precipitada por saturación completa (superior al 50 %) con sulfato amónico.

El fibrinógeno se obtiene con la fracción de globulinas a no ser que se realice un tratamiento previo con una concentración en torno al 20% de sulfato amónico. Este procedimiento permite, por tanto, obtener la fracción globulina, que representa alrededor del 56 % de las proteínas del plasma sanguíneo porcino (14,5%  $\alpha$ -globulina, 11 %  $\beta$ -globulina y 31 %  $\gamma$ -globulina), la de albúmina que supone el 42 % (41% albúmina y 0,3 % prealbúmina) y el fibrinógeno, que representa el 2 % de las proteínas.

Un procedimiento conocido desde antes de la década de los 40 diseñado para la sangre humana (Cohn, 1948) y que ha ido perfeccionándose en las últimas décadas permite obtener cuatro fracciones de proteínas del plasma sanguíneo: la fracción F1 representada por el fibrinógeno, la F2 constituida principalmente por  $\gamma$ -globulinas, la F3 formada sobre todo por  $\alpha$ - y  $\beta$ -globulinas y la F4 compuesta por albúmina (Figura I.7). El procedimiento de fraccionamiento se basa en la precipitación de distintas proteínas por la adición de etanol en concentraciones crecientes (desde 8 hasta 40 %) a

distintos pH (7-4,5) (Cohn, 1948; Chang Kee y Heuyn, 2000; Moure y col., 2000; Burnouf, 2007).

Con independencia del procedimiento utilizado, las fracciones precipitadas se separan por centrifugación (por ejemplo, 15 min a 10.000 rpm a 4 °C). Las fracciones obtenidas, previo lavado con las soluciones de precipitación, se resuspenden a pH 7,4 y se mantienen en refrigeración. Finalmente, pueden desalinizarse mediante ultrafiltración y/o nanofiltración (Jeon y col., 1999; Belhocine y col., 2000). Las fracciones obtenidas en el primer paso pueden, posteriormente, disgregarse en las proteínas que las constituyen, generalmente mediante técnicas de microfiltración y ultrafiltración tangencial (Cheryan, 1998).

#### **d) Comercialización de los productos derivados de sangre**

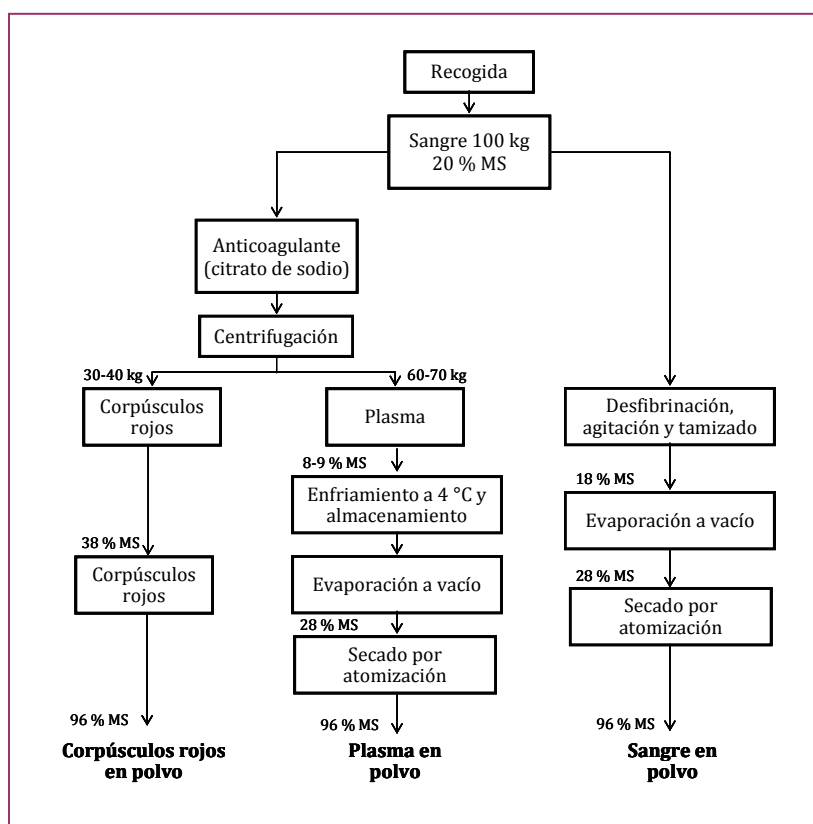
La sangre entera, o cualquiera de sus componentes (tanto la fracción celular como el plasma y sus componentes aislados) pueden presentarse refrigerados (para uso inmediato), congelados, concentrados o deshidratados. Además, el plasma para su utilización directa se puede higienizar mediante bacto-fugación y microfiltración tangencial (Carretero y Parés, 2000).

La concentración puede realizarse por evaporación o por ultrafiltración y puede utilizarse como tratamiento final para la comercialización de los hemo-derivados o como tratamiento previo a la deshidratación. Cuando se ofrecen como concentrados, lo habitual es que su almacenamiento y distribución se realice bajo congelación (- 20 °C).

La deshidratación puede realizarse por métodos convencionales, en contacto con superficies calientes (secaderos de rodillo), en secaderos con aire o mediante liofilización. Esta última proporciona una excelente calidad de producto, pero es más costosa. Un sistema de secado en continuo que permite conservar las características nutritivas y funcionales de las proteínas de la sangre es la deshidratación en atomizadores (Toldrá y Carretero, 1988; Parés y col., 2000) que permite un secado rápido sin sobrecalentamiento del producto (Figura I.8). Para la aplicación de este tipo de secado se requiere que previamente el producto líquido se haya concentrado en un evaporador hasta al menos el 28 % de materia sólida (MS). En la actualidad, la atomización es la forma más habitual de deshidratar los hemoderivados.

Se han aplicado tratamientos con altas presiones a plasma, concentrados de hemoglobina (Parés y col., 2000; 2001; Parés y Leward, 2001; Toldrá y col., 2002a,b y

2004) e hidrolizados de hemoglobina decolorados (Toldrá, 2002a,b) con buenos resultados para su conservación.



**Figura I.8.** Obtención de distintos productos a partir de la sangre.

Adaptado de Madrid (1999).

En conjunto, y dependiendo del tratamiento aplicado, en el mercado pueden encontrarse desde sangre deshidratada, también denominada “albúmina negra” o “polvo de sangre” (soluble en agua y de color marrón oscuro), distintos tipos de harina de sangre (obtenida de la deshidratación de la sangre entera o de la fracción celular después de la separación del suero o del plasma), harinas o productos en polvo de plasma, íntegro o enriquecido en alguna de sus proteínas, concentrados de plasma o de alguna de las proteínas de la sangre y diversos hidrolizados de proteínas.

A pesar de los esfuerzos realizados para dar a conocer que las proteínas de la sangre son seguras para su uso en la industria alimentaria, el consumidor sigue manteniendo cierto recelo a cerca de su consumo. Sin duda, son múltiples las causas que contribuyen a esta situación (Harbin, 1996), entre las que cabe destacar el uso fraudulento (desplazando proteínas de mayor valor comercial sin indicación en el

etiquetado de los productos) con la consiguiente propagación de connotaciones negativas a su empleo, la asociación de la sangre a la transmisión de enfermedades, así como razones sociales y religiosas (por ejemplo, el colectivo musulmán, para el que está prohibido su consumo). El uso de sangre, o de hemo-derivados, al igual que cualquier otro ingrediente, debe indicarse claramente en el etiquetado del producto para que el consumidor pueda decidir sobre su adquisición.

#### **e) Características nutritivas de la sangre**

El contenido en proteínas de la sangre confiere un gran valor a este producto como complemento nutricional (Delaney, 1975; Pierce y col., 2005). A este respecto, la sangre presenta todos los aminoácidos esenciales para la nutrición humana (Tybor y col., 1975; Begin col., 2008); su contenido en lisina y treonina es muy elevado, aunque es deficiente en isoleucina y pobre en metionina. La harina de sangre muestra además un elevado coeficiente de digestibilidad (99 %), ligeramente superior al presentado por la harina de pescado (96-97 %), de carne y huesos (87-89 %).

En un análisis más detallado de los atributos nutricionales de la sangre, destaca la fracción celular por su balanceado perfil de aminoácidos esenciales y, sobre todo, por su contenido de hierro asimilable (Martínez-Navarrete y col., 2002; Vaghefi y col., 2002; Hallberg y col., 1992). Sin embargo, su intenso color rojo y su sabor metálico limitan su consumo, tanto para la alimentación humana como animal, hasta tal punto que, a veces, no puede incorporarse más allá del 1-2 % (en materia seca). Cabe indicar además, la inestabilidad de su color rojo que en poco tiempo adquiere tonalidades marrón oscuras, e incluso negras, por la oxidación del hierro y la transformación de la hemoglobina en metahemoglobina (hierro en estado férrico). Sin embargo, las características de esta fracción permiten obtener productos cárnicos, a base de sangre, como morcillas y algunos embutidos con atributos sensoriales muy valorados por muchos consumidores.

Se han realizado varios intentos para incrementar el aprovechamiento de la fracción celular de la sangre (Cheftel, 1989; Hagi y col., 1992; Duarte, 1999; Álvarez y col., 2009), generalmente basados en la rotura de la molécula de hemoglobina (Figura I.7) en su componente globina (proteico) y hemo (portador del hierro) (Tybor y col., 1975; Lee y col., 1991; Toldrá y col., 2005a,b). En el mercado europeo existen numerosos productos sanguíneos decolorados con agua oxigenada siguiendo distintos procedimientos (Wismer-Pedersen, 1980). Se ha ensayado también la posibilidad de

utilizarse como colorante, estabilizando el color rojo de la hemoglobina (Toldrá y col., 2000; Salvador, 2006).

### **f) Propiedades funcionales de las proteínas de la sangre y su aplicación en la industria alimentaria**

Dado el contexto en el que se desarrolla la presente tesis doctoral, en esta memoria sólo se hace referencia al uso de las proteínas de sangre para la alimentación humana, sin incluir su empleo en la producción animal y en otros sectores industriales, incluido el uso en la industria alimentaria relacionado con la elaboración de alimentos (por ejemplo, como clarificante), donde cabría indicar múltiples líneas de aplicación e investigación.

La sangre puede utilizarse directamente para la formulación de productos que se sometan a tratamiento térmico. Sin embargo, las principales aplicaciones de este subproducto derivan de sus fracciones. Las proteínas de la sangre, y en concreto las del plasma, tienen gran interés para la elaboración de alimentos por sus diversas propiedades funcionales que las capacitan para múltiples usos potenciales y aplicaciones tecnológicas. En general, puede decirse que las proteínas sanguíneas presentan una estructura favorable para el establecimiento de interacciones proteína-agua (hidratación) y proteína-proteína a través de la formación de puentes disulfuro, interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno o fuerzas de van der Waals (Dalglish y Hunt, 1995). En consecuencia, presentan una elevada solubilidad (lo que facilita su incorporación a distintas formulaciones) y CRA (Lee y col., 1991). En conjunto, son excelentes ingredientes para la elaboración de un amplio abanico de productos por su capacidad emulsionante, espumante, espesante, gelificante y antioxidante (Álvarez y col., 2009). La globina y la albúmina presentan una solubilidad y una capacidad espumante muy elevadas, pero su capacidad emulsionante es más baja que la de las proteínas fibrosas. El principal representante de estas últimas, el fibrinógeno, presenta un comportamiento diferente, ya que tiene una solubilidad muy baja, pero una capacidad espumante y emulsionante muy elevada (Álvarez y col., 2009).

En sistemas constituidos por emulsiones o espumas, las proteínas del plasma actúan formando películas en las interfases (agua/aire, agua/aceite, etc.). Combinaciones de albúmina bovina y plasma (en proporción 1:1, v/v) han mostrado mayor eficacia que la albúmina aislada (Murphy y Howell, 1991), debido a que las interacciones no covalentes entre distintas proteínas incrementan la estabilidad de las

interfases (Dickinson y McClements, 1996). Además, en la elaboración de distintos productos, las proteínas de la sangre presentan una capacidad emulsionante superior a la de otras de mayor coste económico, como caseínas, proteínas de soja y ovoproteínas (Crenwelge y col., 1974; Nakamura y col., 1984; Silva y col., 2003; Wilde y col., 2004).

Por otra parte, las proteínas del plasma sanguíneo son una alternativa interesante para sustituir a otras proteínas potencialmente alergénicas (FALCPA, 2004), como las del suero de leche, soja, huevo y gluten de cereales (gliadina y glutenina). Cabe indicar que no se han descrito intolerancias o alergias alimentarias a las proteínas de la sangre (FALCPA, 2004).

Otro de los beneficios del empleo de las proteínas del plasma sanguíneo se encuentra en su capacidad antioxidante. Varios autores (Rodríguez, 1986; Halliwell, 1988) han asociado las propiedades antioxidantes de las proteínas del plasma a su contenido en cisteína y metionina. Los grupos -SH de estos aminoácidos bloquearían radicales libres mediante la donación de iones de hidrógeno. Esta acción también la ejercen aminoácidos como histidina y triptófano, pero a través de la reducción de dobles enlaces presentes en su estructura. Por este mecanismo, en la seroalbúmina bovina, ya sea por calentamiento o por la acción de agentes reductores, se producen grupos -SH libres al reducirse los puentes disulfuro en gran cantidad y, por consiguiente, aumenta la capacidad antioxidante. La actividad antioxidante óptima de esta proteína se ha detectado a pH de 8,6. Es importante destacar que la reducción de puentes disulfuro de la seroalbúmina no afecta a su solubilidad como ocurre con otras proteínas, como la albúmina de huevo (Rodríguez, 1986). Cabe añadir que algunos hidrolizados de plasma sanguíneo también presentan considerable actividad antioxidante, y algunos autores (Wang y col. 2008; Xu y col., 2009) han recomendado su empleo como antioxidante natural para los alimentos.

El plasma puede adicionarse como sustituto o suplemento de proteína cárnica en la elaboración de diversos productos. Por ejemplo, en hamburguesas es posible sustituir hasta un 10% de la carne de la formulación original por proteínas plasmáticas mezcladas con un 10% de grasa y obtener un producto de excelentes características sensoriales (Macedo, 2004). Además, por extrusión de las proteínas de plasma se pueden obtener texturas fibrosas similares a la muscular, con las que pueden elaborarse análogos de carne.



Las proteínas del plasma pueden también utilizarse para la obtención de productos cárnicos reducidos en grasa, por ejemplo para sustituir parcialmente el componente lipídico de patés (Viana y col., 2005), mortadelas o salchichas (Cofrades y col., 2000).

La CRA y la capacidad de gelificación (en concreto de termogelificación) de las proteínas del plasma confieren mejor textura y elasticidad a los productos cárnicos cocidos, contribuyendo a la disminución de mermas durante la cocción (Sclar, 2009). Además, favorecen la formación de emulsiones cárnicas, aportan un color atractivo y mejoran la relación costo-beneficio de estos productos.

La actividad emulsionante de estas proteínas es compleja y depende de múltiples factores, como la concentración proteica, el tipo de grasa, la velocidad y el tiempo de mezcla, entre otros (Hooper, 2006). Por otra parte, la adición de estas proteínas, en especial de la albúmina bovina, en elevados porcentajes (por encima del 20%) puede dar lugar a olores extraños durante la cocción, debido a la desnaturalización térmica (Del Hoyo y col., 2007).

El plasma sanguíneo también puede adicionarse, con distintos fines, a productos fermentados crudos y curados, por ejemplo para reducir las pérdidas de peso durante la maduración. Sin embargo, las proteínas del plasma presentan un punto isoeléctrico en un intervalo de pH en el que frecuentemente se ubican los productos cárnicos fermentados, lo que limita sustancialmente su capacidad emulsionante, de gelificación (aparecen geles blandos y exudativos) y su CRA (Parés y col., 1998; Dávila y col., 2006). Para cambiar el comportamiento de las proteínas del plasma a valores de pH ácidos se ha utilizado MTGasa, sola o en combinación con cisteína, como factor reductor, consiguiéndose una potenciación del efecto gelificante (Fort y col., 2006; Saguer y col., 2007).

En la elaboración de productos a partir de *surimi* se han utilizado proteínas de plasma sanguíneo como inhibidores de proteasas endógenas (Visessanguan y col., 2000).

En el caso de productos de panadería, la adición de proteínas de plasma mejora, por un lado, las propiedades espumantes y el hinchamiento de la masa de panificación y, por otro, el aporte de aminoácidos esenciales con el consiguiente beneficio nutricional (Ockerman y Hansen, 1994). Con este mismo fin, se ha utilizado plasma en la elaboración de fideos, galletas, pizzas, bizcochos y distintos productos elaborados con

cereales (Johnson y col., 1979; Pellegrino y col., 1996; Silveira y col., 1999; Yousif y Cranston, 2003).

En la elaboración de varios tipos de productos (derivados de la panificación, cárnicos, etc.), las proteínas del plasma pueden sustituir a las de huevo con considerables ventajas económicas, además de servir para controlar problemas de intolerancia a estas proteínas (Hickson y col., 1980; Myhara y Kruger, 1998; Ashwini y col., 2009). En concreto, la albúmina de sangre puede emplearse como sustituto de la albúmina de huevo deshidratada. No obstante, en algunos productos, se han detectado cambios de olor cuando se sobrepasan ciertos niveles de adición de proteínas de plasma de origen bovino (Myhara y Kruger, 1998), lo que puede reducir su aceptación por parte del consumidor. Por otra parte, varios autores han indicado que el plasma en polvo tiene mayor capacidad de ligazón y de cohesión de porciones cárnicas que otros sistemas proteicos como harinas de carne, gelatina, gluten de trigo, extractos proteicos de soja y combinaciones alginato sódico y carbonato, aunque es menos eficiente que el huevo en polvo (Lu y col., 1999).

La posibilidad de incorporación de proteínas del plasma sanguíneo en la elaboración de queso también se ha investigado, obteniéndose productos (quesos tipo manchego) con características sensoriales cercanas a las del producto original con niveles de adición de hasta 10 g/L de leche (Valdés, 1998).

Otra aplicación de las proteínas de plasma sanguíneo que se está investigando es la obtención de hidrolizados proteicos y péptidos bioactivos (Wanasundara y col., 2003). La albúmina y las globulinas del plasma se han utilizado para la producción de péptidos inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, causante de algunos problemas de hipertensión. Se ha observado que la hidrólisis de la albúmina con alcalasa (proteasa alcalina, producida a partir de *Bacillus licheniformis*) rinde fracciones peptídicas activas frente a la enzima mencionada que podrían utilizarse para la elaboración de alimentos funcionales antihipertensivos (Chang Kee y Heuyn, 2000; Wanasundara y col., 2003).

Asimismo, también se han obtenido péptidos con importante actividad antigenotóxica a partir de hidrolizados de proteínas de plasma por alcalasa, neutrasa, pepsina y tripsina (Park y Hyun, 2002). Los péptidos con mayor actividad preventiva del daño del ADN han sido los obtenidos a partir de albúmina por acción de pepsina y alcalasa. Probablemente, estos resultados se deben al mayor contenido de esta proteína

en aminoácidos aromáticos. Estos resultados sugieren la utilización de la albúmina bovina como fuente para la producción de péptidos con actividad quimioprotectora.

Al igual que las proteínas del plasma, la fracción celular presenta también propiedades funcionales interesantes (Toldrá, 2002a, 2004). A partir de hidrolizados de hemoglobina de origen bovino se han identificado péptidos bioactivos con efecto antibacteriano (Nedjar-Arroume y col., 2006) y actividad antioxidante (Wei y col., 2009).

El conocimiento de las formas de interacción de las proteínas de la sangre con distintos componentes (Comfort y Howell, 2002; 2003) y el análisis de sus propiedades funcionales es de gran interés para el desarrollo de nuevas aplicaciones y el diseño de nuevos productos. A este respecto, uno de los usos más recientes de las proteínas del plasma sanguíneo es su empleo como agentes de ligazón o de cohesión en frío, función que se atribuye fundamentalmente al fibrinógeno. En este contexto, aislados de fibrinógeno y trombina, y preparados de plasma enriquecidos con factores de la coagulación, deshidratados o congelados, han mostrado capacidad para unir porciones cárnicas frescas consiguiéndose elevada cohesividad, y han sido utilizados para elaborar carnes reestructuradas o reconstituídas. Los buenos resultados obtenidos en este campo, llevaron a planear la presente investigación que con más detalle se expresa en la justificación del trabajo (Capítulo II).

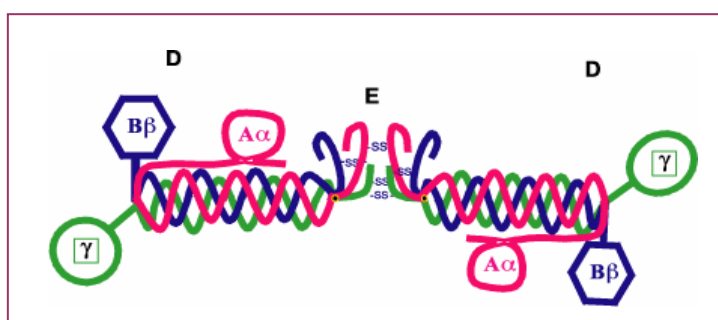
Entre los agentes ensayados como medio de reestructuración de la carne sin necesidad de aplicar calor, cabe citar la celulosa microcristalizada y sus geles, hidrocoloides tales como alginatos, carrageninas (tipo iota y kappa), goma xantano y guar (Pérez-Mateos y col., 2001) y la ya mencionada TGasa. Sin embargo, es importante resaltar una ventaja sustancial de los derivados del plasma sanguíneo para esta función, consistente en que permiten elaborar productos cárnicos sin la introducción de compuestos ajenos a la propia carne. Además, la posibilidad de disponer de derivados de plasma de distintas especies de abasto evita la introducción de componentes de especies extrañas a la composición del producto que quiera elaborarse, en nuestro caso porcino.

### 1.4.2.2. FIBRINÓGENO y TROMBINA COMO SISTEMA DE LIGAZÓN EN FRÍO

El binomio fibrinógeno-trombina se ha utilizado para dar consistencia en frío a productos cárnicos reestructurados. Su efecto se relaciona con el proceso de la coagulación sanguínea, es decir, la formación de un gel de fibrina por la acción de la trombina sobre el fibrinógeno. A continuación se describen las características estructurales de los dos componentes de este sistema y los fenómenos fisiológicos en los que participan.

#### A) Estructura del fibrinógeno

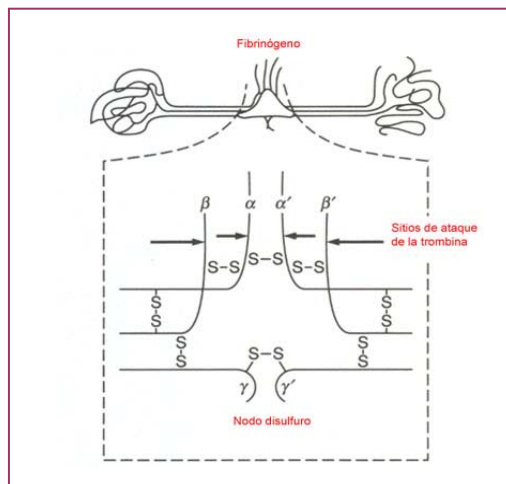
El fibrinógeno es una glicoproteína plasmática con un peso molecular de aproximadamente 340 kDa y una longitud de 46 nm, que se sintetiza en las células hepáticas y tiene una vida media de unas 100 horas (Herrick y col., 1999). Presenta un punto isoeléctrico de 6,5 (Machovich, 1986; Tsai y col. 2006). También se conoce como factor I en la cascada de la coagulación sanguínea. Está compuesto por un dímero de tres pares de cadenas polipeptídicas ( $A\alpha$ ,  $B\beta$  y  $\gamma$ ) unidas por 29 puentes disulfuro (Figura I.9) en su región N-terminal, con un peso molecular de 64-67 kDa, 56-57 kDa y 47-48 kDa, respectivamente (Binnie y Lord, 1993). Las cadenas  $A\alpha$ ,  $B\beta$  y  $\gamma$  constan de 610, 461 y 411 residuos aminoacídicos, respectivamente (Blombäck, 1996; Herrick y col. 1999).



**Figura I.9.** Esquema de la molécula de fibrinógeno en la que se muestran los 3 tipos de cadenas ( $A\alpha$ ,  $B\beta$  y  $\gamma$ ) y algunos de los puentes disulfuro.

La molécula de fibrinógeno (Scheraga y col. 2004) contiene tres dominios claramente diferenciados: dos terminales, conocidos como dominios D (67 kDa), unidos por uno de sus extremos a un dominio central, denominado dominio E (33 kDa),

mediante una triple hebra de cadenas polipeptídicas, que se cree se encuentran en forma de  $\alpha$  hélice (Figuras I.9 y I.10).



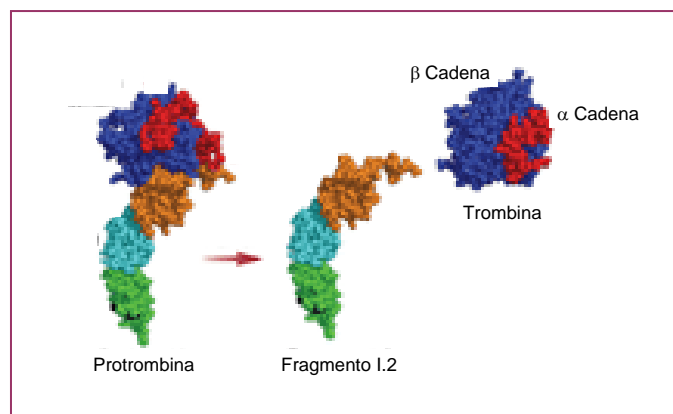
**Figura I.10.** Representación esquemática y vista ampliada del dominio E (Figura I.9) de una molécula de fibrinógeno en la que pueden apreciarse los puentes disulfuro entre las tres cadenas.

### B) Estructura de la trombina

La trombina (E.C 3.4.21.5) es una enzima multifuncional de la familia de las serín proteasas, con una débil capacidad proteolítica y un peso molecular de 39 kDa (Goldsack y col., 1998; Scheraga y col. 2004). Presenta actividad enzimática en un amplio intervalo de valores de pH comprendido entre 5 y 10 (Machovich, 1984), siendo óptima en torno a 8 – 8,3 (Machovich, 1984; Orthner and Kosow, 1980, Barrett et al., 2004). Su punto isoeléctrico se encuentra alrededor de 7,5 (Barrett y col., 2004), con pequeñas variaciones dependiendo de la especie de procedencia; así por ejemplo, la trombina humana presenta valores en un intervalo de pH entre 7,2 y 7,6 (Butkowski, 1977; Machovich, 1986) y la de origen bovino entre 7,05 y 7,11 (Winzor y col., 1964).

El precursor de esta enzima es la protrombina; se trata de una molécula de 582 residuos aminoácidos que se sintetiza en el hígado y que por acción del factor Xa (Goldsack y col., 1998; Scheraga y col. 2004) se escinde para dar lugar a una molécula de trombina (Figura I.11), la cual está formada por dos cadenas polipeptídicas, denominadas  $\alpha$  y  $\beta$ , unidas por cuatro puentes disulfuro (Figura I.11). Esta enzima presenta un centro catalítico muy pequeño que se encuentra constituido por los aminoácidos His-57, Asp-102 y Ser-205 y tiene carácter hidrofóbico. En lo que se

refiere al sustrato, presenta afinidad por aminoácidos apolares precedidos por arginina (Goldsack y col., 1998) y tan sólo puede hidrolizar los enlaces arginina-glicina cercanos a los grupos amino terminales de las cadenas  $\text{A}\alpha$  y  $\text{B}\beta$  del fibrinógeno (Figuras I.9 y I.10).



**Figura I.11.** Estructura de la protrombina y la trombina.

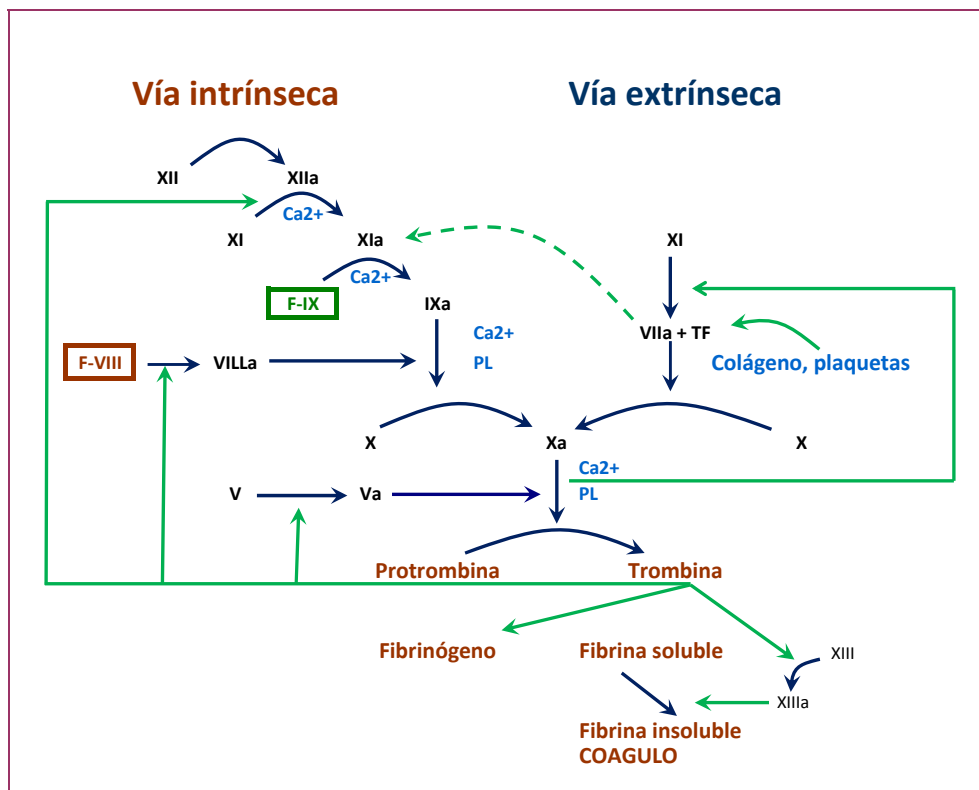
Adaptado de Kaushansky y col. (2010).

### C) Actividad fisiológica del fibrinógeno y de la trombina

Cuando se produce un daño vascular, el fibrinógeno participa en el control de la pérdida de sangre mediante dos mecanismos. Por una parte, actúa como una proteína de adhesión esencial para la agregación plaquetaria. Por otra, en la reacción final de la cascada de la coagulación (Figura I.12), el fibrinógeno se convierte en fibrina, por la acción de la trombina. Como se ha mencionado, la trombina, al catalizar los enlaces arginina-glicina cercanos a los grupos amino terminales de las cadenas  $\text{A}\alpha$  y  $\text{B}\beta$ , libera los fibrinopéptidos A y B, respectivamente (Figura I.13). El resto de la molécula es el monómero de fibrina que permanece intacto. De esta forma, la eliminación de los dos fibrinopéptidos, deja disponibles los grupos C-terminales en los monómeros de fibrina que pueden reaccionar (Scheraga y col. 2004) produciéndose polímeros de fibrina. El establecimiento de uniones intermoleculares (Herrick y col., 1999) da lugar a la formación de una red tridimensional y finalmente a un coágulo de fibrina (Figura I.13).

La actividad de la trombina se encuentra fisiológicamente regulada y controlada por varios factores. El proceso de coagulación se inicia cuando la protrombina circulante se convierte en trombina activa, en presencia de iones de calcio, en tejidos dañados (Figura I.12). La vida media de la trombina en el suero sanguíneo es de 14

segundos. Transcurrido este tiempo, inhibidores específicos se unen a ella y la inactivan (Goldsack y col., 1998).



**Figura I.12.** Etapas de la cascada de la coagulación. Adaptado de Moreno, (2013).

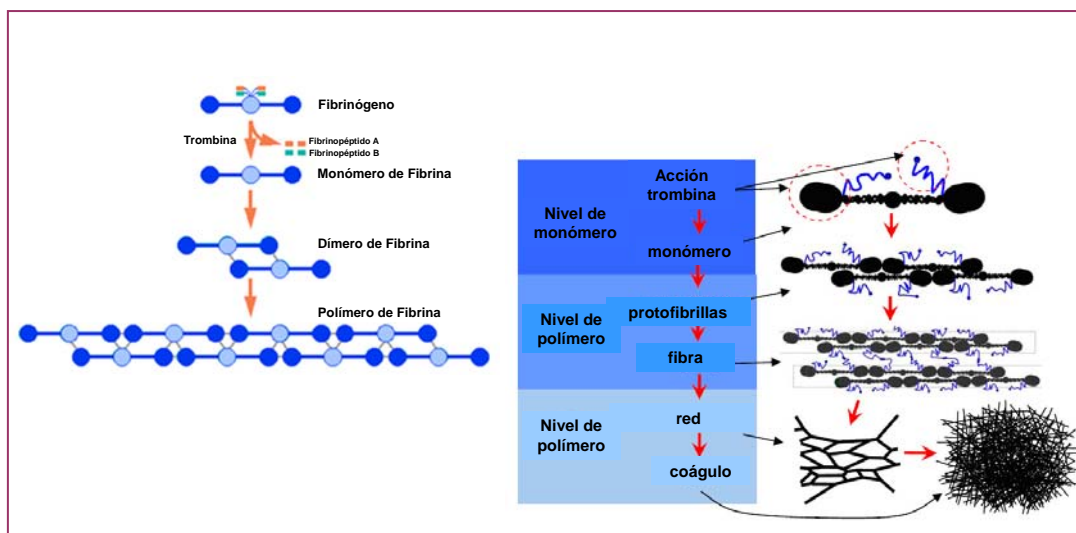
En conjunto, en la conversión de fibrinógeno en fibrina se distinguen tres etapas reversibles:

- 1)  $\text{Fibrinógeno} \xrightleftharpoons{T} \text{monómero de fibrina} + 2 \text{ FPA} + 2 \text{ FPB}$
- 2)  $n f \rightleftharpoons f_n$
- 3)  $m f_n \rightleftharpoons \text{fibrina}$

En primer lugar, la trombina (T) produce la proteólisis del fibrinógeno de una forma controlada rindiendo los fibrinopéptidos A y B (FPA y FPB) y dando lugar a monómeros de fibrina ( $n f$ ), que en una segunda etapa forman polímeros intermedios ( $f_n$ ) mediante interacciones no covalentes, y éstos finalmente se agregan para formar el coágulo de fibrina (Scheraga y col., 2004).

Para expresar la actividad de la trombina existen dos unidades, la internacional (UI) establecida por la Organización Mundial de la Salud (OMS), y la propuesta por el

National Institute of Health (NIH) de EE. UU., siendo una unidad NIH equivalente a 1,1 – 1,3 UI (Gaffney y Edgell, 1995; Whitton y col., 2005). No se han observado diferencias en la estimación de la actividad de la trombina utilizando fibrinógeno humano o de origen bovino o plasma humano (Whitton y col., 2005).



**Figura I.13.** Representación esquemática de la formación de coágulos de fibrina a partir de fibrinógeno. Adaptado de CISMM, (2013).

#### **D) Producción industrial y comercialización del sistema fibrinógeno-trombina**

Se han descrito diversos procedimientos (por ejemplo, Brosstad, 2005; Manseth y col., 2003; Álvarez y col., 2009) para la obtención de fibrinógeno y trombina (incluida su formación a partir de protrombina). Sin embargo, la producción industrial de aislados de estos dos compuestos es bastante limitada y sólo algunas empresas internacionales los incluyen en su oferta de productos. Su comercialización se realiza en la mayoría de los casos como productos liofilizados de origen bovino (por ejemplo, Akron Biotech, Sigma-Aldrich, etc.). Sin embargo, en la actualidad también se encuentran concentrados de ambos principios, fibrinógeno (5,0 – 5,6 mg/mL) y trombina (18 – 20 NIH/mL), de origen bovino y porcino, especialmente destinado a la industria alimentaria y que se comercializa bajo congelación (Fibrimex®, Sonac B.V. [Loenen, Holanda]). Los compuestos concentrados tienen la ventaja respecto a los deshidratados de que, tras su descongelación, son líquidos, por lo que son más fáciles de mezclar y pueden adicionarse directamente a la formulación del producto que se



desee elaborar, mientras que las formas deshidratadas a veces presentan problemas de reconstitución, especialmente en el caso del fibrinógeno, que como se ha mencionado tiene una solubilidad menor que otras proteínas del plasma. Como desventaja, cabe indicar la dependencia para su conservación de la disposición de equipos de congelación, así como mayor volumen de almacenamiento.

El concentrado de fibrinógeno presenta una tonalidad amarillo-anaranjada. Su incorporación a los elaborados cárnicos no supone cambios de sabor ni de olor. Por otra parte, el preparado de trombina es incoloro e incluye calcio (2,2 – 2,4 %, p/p) para favorecer su actividad sobre el fibrinógeno. Este producto se elabora a partir de sangre higiénica obtenida en mataderos que cumplan los Reglamentos (CE) Nº 852, 853 y 854 (paquete de higiene). El fraccionamiento se realiza por métodos físicos (precipitación, ultracentrifugación, ultrafiltración, y cromatografía de intercambio iónico, fundamentalmente) siguiendo los procedimientos descritos en normas ISO sobre gestión de la calidad y gestión medioambiental.

Independientemente de la forma de comercialización, el uso del sistema fibrinógeno-trombina, como sistema binario de ligazón, requiere la distribución del fibrinógeno y de la enzima en envases separados para su mezcla inmediatamente antes de su uso o en la propia formulación del producto durante su elaboración. El fibrinógeno puede transformarse en fibrina por la acción de trombina de cualquier mamífero, por lo que podrían utilizarse proteínas de distinto origen.

En el mercado también se encuentra un producto deshidratado en polvo elaborado a partir de un concentrado de fibrinógeno y de trombina (Fibrimex® powder), en el que en una sola matriz se encuentra el sustrato (fibrinógeno) y la enzima (trombina). Su conservación está favorecida por su baja  $a_w$  ( $< 0,20$ ). Este producto puede incorporarse directamente a la mezcla cárnica a tratar o previa rehidratación.

### **E) Aspectos legales relacionados con el empleo de fibrinógeno-trombina**

El uso del sistema binario fibrinógeno-trombina para la elaboración de productos cárnicos reestructurados está aprobado por USDA, FDA y CFIA (Canadian Food Inspection Agency) para su uso en cualquier tipo de carne, pescados y mariscos. La inspección y etiquetado está regulada por el Food Safety and Inspection Service (FSIS, 2005). En EE. UU el límite de adición del sistema para la reestructuración de carnes es de un 10%. Se requiere indicar en el etiquetado del producto elaborado (lomo, filete,

reestructurado cárnico, etc.) “*formado con*” fibrinógeno y trombina y la especie de procedencia (bovino o porcino). Si se emplea menos de un 7 % debe indicarse “*formado con*” “fibrina”, este término puede sustituirse por “proteínas del plasma” o “fibrinógeno y trombina” (indicando la especie de procedencia, bovina o porcina).

En el caso de la UE recientemente se ha procedido a la unificación de la reglamentación para la autorización de aditivos, enzimas, y coadyuvantes (Reglamento (CE) nº 1331/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo por el que se establece un procedimiento de autorización común para los aditivos, las enzimas y los aromas alimentarios). En este procedimiento, se incluye la forma en la que un fabricante de enzimas debe presentar su solicitud para que sus productos se autoricen e incluyan en una lista oficial. La previsión es que se presenten más de 1.000 expedientes para someterse a evaluación por la Comisión Europea y la EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria). El plazo de entrega de expedientes a trámite comprende desde el 11 de septiembre de 2011 hasta el 11 de septiembre de 2013. Por lo tanto, cabe esperar una regulación de las enzimas que puedan utilizarse para la carne reestructurada o reconstituida.

En abril de 2005, la EFSA, basándose en el informe de una comisión de expertos, declaró que el uso de fibrinógeno y trombina para la reconstitución de carne no planteaba problemas para la seguridad alimentaria (EFSA, 2005; Antón, 2005). Pese a este dictamen, en mayo de 2010, el Parlamento Europeo bloqueó la autorización de la trombina como aditivo alimentario (Resolución del Parlamento Europeo, de 19 de mayo de 2010, sobre el proyecto de Directiva de la Comisión por la que se modifican los anexos de la Directiva 95/2/CE). Los diputados subrayaron que esta enzima natural puede inducir a error al consumidor y alegaron que “los consumidores europeos debían estar seguros de que compraban un verdadero filete y no trozos de carne pegada”. En opinión de muchos expertos, esta manifestación simplemente expresa el desconocimiento de la estructura de muchos productos cárnicos, que sin necesidad de recurrir a esta estrategia pueden presentar el aspecto de una pieza íntegra como ocurre, por ejemplo, con fiambres de jamón o paleta de cerdo o galantitas de ave. No obstante, los estados miembros podrían autorizar el uso de trombina como un coadyuvante.

Otro de los pilares sobre los que se argumentó la no inclusión de trombina en la lista de aditivos, fueron los riesgos microbiológicos derivados de la mayor

manipulación de las porciones cárnicas. No obstante, hay que apuntar que la elaboración de estos productos no conlleva mayores posibilidades de contaminación que un producto picado, por ejemplo.

### **I.4.2.3. PLASMA SANGUÍNEO ENRIQUECIDO CON FIBRINÓGENO COMO AGENTE DE LIGAZÓN EN FRÍO**

El plasma sanguíneo, en estado líquido o deshidratado, no tiene capacidad de unir o cohesionar en frío trozos de carne y para que la adquiera se requiere incrementar el contenido de fibrinógeno, mantener funcional esta molécula y, de acuerdo con lo anteriormente indicado, activar las enzimas necesarias para su transformación en fibrina. Este preparado se comercializa en forma deshidratada en polvo y se obtiene siguiendo el método patentado por Roodink y Zuijdweg (2003), que permite incrementar la concentración de fibrinógeno en el plasma al menos hasta un 4 % en extracto seco. En el proceso se recurre a la evaporación a baja temperatura y a técnicas de membrana, y finalmente a la deshidratación por atomización. Las condiciones de procesado se controlan para asegurar que la temperatura del producto no supera los 60 °C. Además de la actividad ligada al fibrinógeno, el plasma obtenido permite disponer de las propiedades funcionales de las restantes proteínas que lo constituyen. El producto puede utilizarse como componente único y no requiere la incorporación adicional de trombina, dado que el contenido enzimático del plasma posibilita la formación de fibrina. Esta es una ventaja sobre los sistemas binarios, ya que no es necesario proceder a la mezcla previa de los componentes y puede utilizarse en polvo incorporándose directamente a la carne, puesto que se ha comprobado que el agua liberada por la carne es suficiente para rehidratar parcialmente el plasma y permitir que se produzca el paso de fibrinógeno a fibrina. No obstante, también puede utilizarse previamente rehidratado (Roodink y Zuijdweg, 2003). Adicionalmente, el plasma puede someterse a tratamientos de aglomeración o instantaneización para conseguir una mejor solubilización y dispersión del producto. El producto así procesado presenta una solubilidad del 95% (Roodink y Zuijdweg, 2003).

Un producto enriquecido en fibrinógeno de estas características se comercializa por la empresa Sonac B.V. para su empleo en la industria alimentaria con la denominación de Plasma Podwer FG. Este ha sido el utilizado en las investigaciones que se describen en la presente tesis doctoral. Su elección, como agente de ligazón se realizó teniendo en

cuenta la facilidad de manejo y de etiquetado del producto, al tratarse de plasma sanguíneo sin incorporación adicional de trombina.

#### **I.4.2.4. EFECTO COHESIVO DEL SISTEMA FIBRINÓGENO-TROMBINA**

El sistema binario fibrinógeno-trombina y el plasma deshidratado enriquecido con fibrinógeno se utilizan en la industria alimentaria fundamentalmente para unir porciones cárnicas frescas (Boles y Shand, 1998; Flores y col., 2007). No obstante, también se han realizado estudios de cohesión de alimentos vegetales (Roodink y Zuidweg, 2003). Diversos factores, como la concentración de fibrinógeno y trombina y la fuerza iónica del medio modifican las características y la estabilidad de los geles resultantes (Ryan y col., 1999; Gentry, 2004; Weisel, 2004).

En la industria cárnica ambos preparados se han adicionado además a productos cárnicos cocidos. Por ejemplo, la incorporación del plasma enriquecido en fibrinógeno en un 1 % mejora la textura y estabilidad de salchichas tras su cocción. En general su incorporación a los productos cárnicos aumenta la CRA (Chen y Lin, 2002; Roodink y Zuidweg, 2003).

En estos agentes de ligazón el mecanismo que opera es la formación de un gel o entramado de fibrina en el que quedan atrapadas las porciones cárnicas. Se ha observado que, además de las uniones entre los polímeros de fibrina, se producen interacciones entre ésta y las proteínas miofibrilares y del estroma (colágeno fundamentalmente), lo que explicaría la estabilidad de las porciones cárnicas unidas con este sistema (Kahn y Cohen, 1981; Piette, 1999). El procesado puede realizarse a temperaturas de refrigeración (0 – 7 °C) y la cohesión del producto es óptima tras las primeras horas de su incorporación. Sin embargo, la combinación de fibrinógeno y trombina ha de aplicarse rápidamente sobre las superficies cárnicas antes de iniciarse su gelificación, limitación que no se presenta en el caso del plasma deshidratado. Para facilitar la mezcla y manipulación del binomio fibrinógeno-trombina y las porciones cárnicas se han diseñado distintos sistemas que permiten una distribución más homogénea y rápida del agente de ligazón (Paardekooper y Wijngaards, 1989).

Finalmente, conviene destacar que el conocimiento existente sobre el tipo de interacciones y la estructura de los geles que se establecen en distintos sistemas cárnicos es limitado. En este sentido, un conocimiento más amplio en este campo

permitiría un mejor uso y el incremento de las posibilidades de aplicación de estos agentes de ligazón.

*En los siguientes apartados de este capítulo se analizan aspectos relacionados con la metodología utilizada para el desarrollo de la tesis doctoral. Por una parte, se trata el análisis de las características reológicas de los alimentos como medio para conocer su comportamiento mecánico y su textura, y por otro se realizan algunas consideraciones sobre la imagen de resonancia magnética nuclear y la microscopia electrónica de barrido como técnicas útiles en el estudio de la estructura de matrices alimentarias.*

## **I.5. ANÁLISIS REOLÓGICO**

La Reología es la ciencia que estudia la deformación de los materiales sometidos a la acción de fuerzas externas (Bird, 1998). Robert Hooke en 1678 fue el primero en utilizar este término en su obra “Verdadera teoría de la elasticidad”. De una forma genérica, puede decirse que la reología se ocupa de estudiar el flujo de los líquidos y la deformación de los sólidos.

### **I.5.1. CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS, MECÁNICAS Y TEXTURA**

Durante décadas, los estudios reológicos se reducían a aplicar las leyes de Newton para líquidos y la de Hooke para sólidos. Ambas leyes definen dos modelos ideales de comportamiento: el sólido elástico de Hooke y el fluido viscoso newtoniano, a los cuales se acercan, en mayor o menor grado, muchos materiales. Sin embargo, en el ámbito tecnológico, y en la industria alimentaria en particular, la mayoría de las matrices presentan un comportamiento que no puede discriminarse de una forma tan definida.

Las principales características reológicas son la *elasticidad* (propiedad de un material por la que recupera parcial o totalmente su forma y dimensiones originales, al cesar la acción de una fuerza externa), la *viscosidad* (resistencia a fluir de un material) y la *plasticidad* (facultad de un material de ser moldeado por encima del esfuerzo que produce la fluencia pudiendo retener la forma bajo fuerzas finitas). La mayor parte de los comportamientos de los materiales pueden expresarse en función de estas tres características. La viscosidad es el principal componente del comportamiento de los fluidos. En los sólidos intervienen sistemáticamente fenómenos elásticos y plásticos (comprendiendo la ductibilidad y la maleabilidad), siendo la viscosidad el carácter más

difícil de observar (Rao y Steffe, 1992; Rosenthal, 1999; Bourne, 2002; Tabilo y Barbosa, 2005).

El estudio del comportamiento reológico es esencial en numerosos campos y para múltiples aplicaciones (como mecánica de suelos, fatiga de materiales, procesado de polímeros, procesos interfaciales, etc.), incluido el de la Tecnología de los Alimentos. Sin embargo, su aplicación en el ámbito alimentario, especialmente en el caso de los alimentos sólidos, es muy limitado y en muchos casos su análisis se reduce a parámetros relacionados con la textura.

En la elaboración industrial, en cualquier sector, el análisis reológico contribuye a:

1. Controlar los procesos.
2. Optimizar el diseño de máquinas y equipos de procesado.
3. Adecuar las características de una producción.
4. Controlar la calidad de producto.

A pesar de que el comportamiento reológico de los alimentos es complejo, su conocimiento es de gran utilidad, debido al importante papel que desempeña en muchas fases del procesado y manipulación. Su estudio comprende las propiedades mecánicas, y está íntimamente relacionado con la textura del alimento. De una forma general, podría decirse que para un material dado al que se aplica una determinada fuerza, las propiedades mecánicas se limitan a su respuesta ante dicha fuerza, las reológicas explican su deformación y flujo, y la textura se ciñe a las impresiones sensoriales percibidas en la boca. Por tanto, las propiedades mecánicas, entre las que se encuentran la *tenacidad*, la *dureza* y la *fragilidad*, dependen de la resistencia de un material frente a la aplicación de distintas fuerzas (tracción, compresión, impacto, etc.), y la textura es una sensación subjetiva provocada por el comportamiento mecánico y reológico del alimento durante la masticación y la deglución. En conjunto, el comportamiento reológico está condicionado por las características físicas del material, que últimamente dependen de la estructura del mismo.

Los alimentos, debido a la complejidad estructural que presentan, responden de forma muy diferente frente a una determinada fuerza externa. En líneas generales, los alimentos sólidos se deforman irreversiblemente e incluso pueden llegar a quebrarse (como el turrón o las patatas fritas); estos últimos son sólidos duros o rígidos que se rompen bruscamente ante la aplicación de fuerzas más o menos elevadas. Sin embargo,

la mayoría de los alimentos sólidos sólo se deforman en mayor o menor grado antes de quebrarse (sólidos elásticos). Respecto a los alimentos fluidos, la mayoría de los autores (Muller, 1973) los clasifican básicamente en alimentos newtonianos (ejemplo: agua, leche, aceite vegetal, etc.) y no newtonianos (como margarinas, puré de frutas, etc.), según se ajusten, o no, a la ley de la viscosidad de Newton (fluidos no newtonianos independientes del tiempo [pseudoplásticos, dilatantes, plásticos de Bingham y generales o de Herschel-Bulkley] y dependientes del tiempo [fluidos reopécticos y tixotrópicos]).

Algunos materiales, primero se deforman y luego fluyen (Muller, 1973; Rao, 1999; Ferguson y Kemblowski, 1991; Peleg y Bagley, 1983). Se habla entonces de viscoelásticos, con un comportamiento reológico inicial de sólidos elásticos y final de cualquiera de los fluidos indicados. Existen varios alimentos que presentan propiedades viscoelásticas; en general, son geles o productos semisólidos (almidón-gelatina, algunos derivados lácteos y quesos blandos, crema de leche, helados, fideos cocidos, masa de harina de trigo, espumas de proteína, etc.).

### **I.5.2. COMPORTAMIENTO REOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS SÓLIDOS**

Un alimento sólido, al igual que cualquier otro material, por la acción de fuerzas externas experimenta una deformación que se verá controlada por el esfuerzo de éste para retener las condiciones iniciales. Las fuerzas exteriores (cargas), por tanto, originan fuerzas interiores (esfuerzos) en el material en el que se aplican. Resumidamente, puede decirse que la resistencia a la deformación depende de la cohesión molecular y de la estructura interna del material. Toda carga modifica las distancias intermoleculares de un cuerpo sólido. Por ello, la deformación se define como todo cambio en el estado de agregación molecular de un cuerpo motivada por la acción de una fuerza capaz de modificar las fuerzas de cohesión propias. La deformación de un material se expresa como cambios de forma, volumen o de ambos, resultantes de las modificaciones de las distancias relativas entre puntos del mismo.

En los sólidos, las posiciones relativas de las moléculas entre sí, se mantienen en virtud de ciertas fuerzas interiores que se oponen a los cambios de posición de las partículas que los componen, conservando así su forma. La tensión ( $\sigma$ ) es el esfuerzo específico que tiende a equilibrar una fuerza externa ( $F$ ) referido a la unidad de área o



sección ( $S$ ) y puede expresarse como  $\sigma = F/S$ . El proceso se recoge en las denominadas curvas de tensión - deformación.

Como se ha mencionado, los sólidos responden a las fuerzas externas con deformaciones elásticas (reversibles) o inelásticas (permanentes) o con fracturas. Se dice que un material elástico es isótropico cuando presenta iguales respuestas reológicas en todas direcciones. La mayor parte de los alimentos no entran en esta categoría si no que son anisótropicos ya que las condiciones de elasticidad varían según la dirección en que se producen las deformaciones.

En general, el comportamiento reológico y mecánico de las materias primas y de los productos derivados ha de considerarse en todas las etapas vinculadas al control de calidad, procesado y comercialización de los alimentos, lo que implica la necesidad de conocer aspectos tan diversos como el adecuado diseño de los equipos, la elección de distintos sistemas operativos o la selección de un material de envase.

### **I.5.3. MÉTODOS DE ESTIMACIÓN DE LAS PROPIEDADES REOLÓGICAS Y DE LA TEXTURA**

Dada la relación entre las propiedades reológicas y de textura, existe una fuerte cercanía entre los métodos instrumentales utilizados para su estimación. Para conocer el comportamiento de un material, este se somete a ensayos en los que se aplican distintas fuerzas externas de modo que pueda estudiarse su respuesta bajo diferentes condiciones. Según la dirección de las fuerzas aplicadas, se producen diferentes casos de sollicitación. Así se habla de sollicitaciones normales (uniaxiales) cuando la fuerza actúa perpendicularmente a la sección del material y se denominan tangenciales cuando la fuerza actúa en un plano tangente a la sección. El estado de sollicitación puede ser simple, producido por una fuerza (de tracción, compresión o corte), por pares de fuerzas (flexión, torsión) o compuesto por combinación de sollicitaciones simples (flexión-corte, tracción-compresión, etc.). Las sollicitación por tracción y/o compresión son habitualmente utilizadas en el análisis de materiales. En estos ensayos, las fuerzas normales exteriores, de igual magnitud, dirección y sentido contrario, tienden a estirar (tracción) o a prensar (compresión) el material según el eje en el que actúan. En ambos casos, se presenta un esfuerzo uniaxial, es decir, perpendicular al plano sobre el que se aplica la fuerza de tracción o compresión. En la tracción, la carga tiende a separar dos

secciones próximas y, por tanto, la deformación característica es el alargamiento en la dirección de la carga ( $\varepsilon = \Delta l/l$ , siendo  $l$  la longitud inicial y  $\Delta l$  la deformación absoluta) y la reducción de la sección. En la compresión, sin embargo, la carga tiende a acercar dos secciones próximas, disminuyendo la distancia intermolecular. La deformación característica es el acortamiento longitudinal del cuerpo, aumentando la sección transversal. Los resultados suelen recogerse en curvas de tensión-deformación ( $\sigma - \varepsilon$ ). Además, en el estudio de los materiales puede registrarse su comportamiento ante ciertas cargas y su recuperación (carga-descarga) y su posterior sollicitación (curvas de carga-descarga-recarga), así como la evolución de la deformación o la tensión en el tiempo ( $t$ ) de aplicación de una cierta carga ( $\varepsilon - t$  y  $\sigma - t$ ).

La realización de ensayos para determinar el comportamiento mecánico o reológico de alimentos requiere considerar el carácter heterogéneo de muchos de ellos y la posible anisotropía del producto ensayado, lo que obliga a que, en la mayoría de los casos, el estudio tenga que realizarse con un elevado número de muestras y haya que cuidar la elección y preparación de las mismas. Por otra parte, en los alimentos constituidos por tejidos, hay que tener en cuenta el posible carácter ortotrópico (la forma más común de anisotropía), es decir, la variación de la resistencia dependiendo de la dirección de los esfuerzos aplicados. Por ejemplo, la resistencia de la carne varía según la carga se aplique paralela o transversalmente a las fibras musculares. Muchos materiales se caracterizan por su resistencia a la tracción (alargamiento) mientras que otros son más resistentes a la compresión (acortamiento). Por otra parte, en las muestras a ensayar deben fijarse la geometría y dimensiones para que los resultados obtenidos puedan compararse y puedan repetirse el estado de sollicitación y las condiciones de deformaciones y tensiones generales (Honikel, 1998).

Se ha desarrollado un considerable número de métodos instrumentales para la determinación de las propiedades reológicas y mecánicas de alimentos sólidos. Diversos autores han revisado las propiedades reológicas, sus métodos de determinación y los parámetros de los que dependen (Canet y col., 2007; Velásquez y col., 2007; Mohsenin, 1986; Pollak y Peleg, 1980; Steffe, 1996; Zúñiga y col., 2007). En relación con la forma de sollicitación, se distinguen los siguientes ensayos mecánicos: (1) de tracción, que aportan información de la tenacidad (resistencia a la rotura, es decir, capacidad de absorción de energía antes de la fractura) y de la elasticidad de un material, (2) de dureza, que permiten conocer el grado de dureza del material (resistencia que un material sólido opone a la penetración o en general a la

deformación), (3) de impacto o choque, cuya práctica permite conocer la fragilidad (falta de tenacidad y de plasticidad) y (4) tecnológicos, que ponen de manifiesto las características de plasticidad que posee un material para poder moldearlo, doblarlo, embutirlo, etc.

En relación con la textura, en un sentido estricto, ésta debería determinarse mediante técnicas sensoriales por catadores entrenados o no. No obstante, también puede evaluarse mediante técnicas instrumentales (Bourne, 2002; Kilcast, 2004) basadas en el comportamiento mecánico. No obstante, puesto que se trata de métodos indirectos, sus resultados tienen sentido sólo si se puede demostrar su relación conceptual y estadística con los obtenidos mediante análisis sensoriales. Se han desarrollado distintos métodos de esta naturaleza, que pueden agruparse en tres categorías: fundamentales (miden propiedades mecánicas concretas y están poco relacionados con características sensoriales), empíricos (miden parámetros no bien definidos por penetración, cizalla, compresión, extrusión, corte, flujo, mezcla, etc.) e imitativos (simulan las fuerzas y las deformaciones que se producen durante la manipulación del producto). La textura también se ha evaluado, con mayor o menor éxito, por métodos químicos (Lewis, 1993), microscópicos (estudiando la estructura del producto) y fisiológicos (por evaluación, durante la masticación, de la actividad muscular, sonido producido, etc.) (Varela y col., 2008) y por ultrasonidos (Llull y col., 2002).

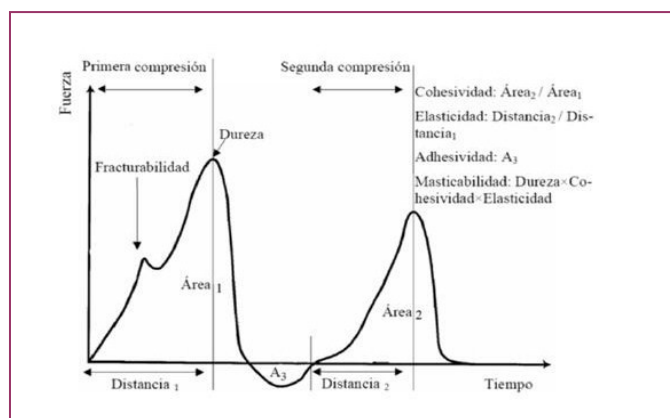
En el presente trabajo, se ha recurrido a un ensayo de tracción para estudiar el comportamiento mecánico y determinar la eficacia de la enzima MTGasa, el sistema fibrinógeno-trombina y las proteínas del plasma sanguíneo como agentes de cohesión a través de la estimación de la fuerza de ligazón. Para el estudio de la textura se ha utilizado un método imitativo, el análisis del perfil textura (TPA, *Texture profile analysis*) y la microscopía electrónica de barrido para establecer su relación con la estructura.

### 1.5.3.1. ANÁLISIS DEL PERFIL DE TEXTURA (TPA)

La textura de un alimento se define como el conjunto de atributos mecánicos, geométricos y superficiales de un producto, perceptibles mediante receptores mecánicos, táctiles y, si es apropiado, visuales y auditivos (ISO 5492-1992). La textura

es una de las características sensoriales más valoradas por el consumidor (Bourne, 2002) y juega un importante papel en el establecimiento de preferencias individuales por determinados alimentos. En este sentido, pequeñas diferencias de textura entre productos similares pueden ser determinantes en el grado de aceptación del alimento por el consumidor.

Entre los métodos instrumentales empleados para la determinación de la textura, el más extendido es, sin duda, el ensayo de imitación de doble compresión denominado TPA. Diversos estudios (Bourne 1982; Honikel, 1998) recogen su empleo en una amplia gama de alimentos, junto con las condiciones de ensayo. El éxito de este método se debe a que proporciona datos del comportamiento mecánico (dureza, cohesividad, viscosidad, elasticidad, adhesividad, fracturabilidad, masticabilidad y gomosidad) que pueden relacionarse de forma razonablemente precisa con el proceso de masticación (Bourne, 1978, 1982, 2002) y con la percepción sensorial (Figura I.14). En la boca, el alimento se somete fundamentalmente a fuerzas de compresión (entre los dientes y lengua y paladar), penetración y corte (dientes). A este respecto, analizadores de textura, como el texturómetro de General Foods o de ensayo universal Instron, se diseñaron para simular el proceso de masticación (Szczesniak, 1963; Bourne, 1978, 1982). En la actualidad, con esta concepción, se encuentran distintos equipos o texturómetros. Estos equipos permiten un estudio amplio del comportamiento de los materiales ante distintas solicitaciones. En el TPA, la masticación se imita sometiendo las muestras generalmente a dos ciclos de compresión-descompresión sucesivos. El comportamiento de la muestra se recoge en gráficas en las que se relaciona la fuerza aplicada y el tiempo de ensayo (Figura I.14).



**Figura I.14.** Gráfica característica del análisis de perfil de textura (TPA) y principales parámetros que se obtienen.

Los parámetros de compresión obtenidos mediante la realización del ensayo de TPA se han utilizado ampliamente en diversos alimentos (cárnicos, quesos, ovoproductos, etc.) como indicadores de la calidad del producto final, así como para la selección de ingredientes, mejora de formulaciones o establecimiento de condiciones de procesado (Bruna y col., 2000; Gimeno y col., 2000; de la Hoz y col., 2004; Mendoza y col., 2001; Muguerza y col., 2001; Tunick, 2000; Visessanguan y col., 2004).

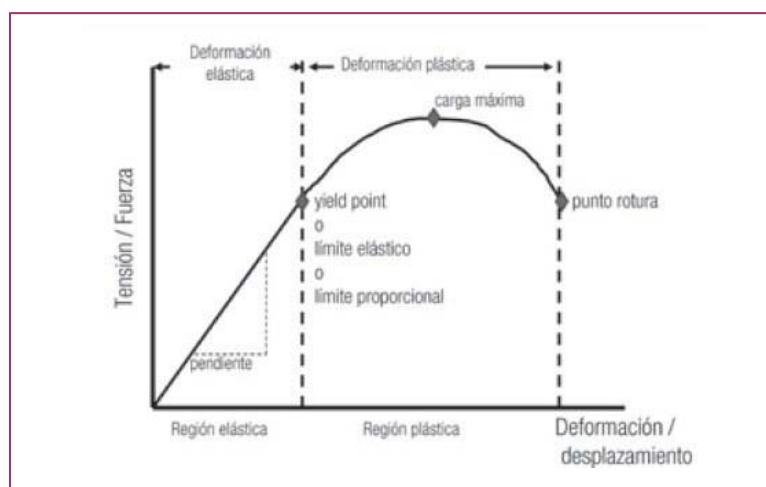
### I.5.3.2. ENSAYOS DE TRACCIÓN

En los ensayos de tracción (también denominados ensayos de tensión simple a tracción, o ensayos de tracción uniaxial) se estudia el comportamiento de un material sometido a tracción creciente y progresiva hasta conseguir la rotura (ensayos destructivos) o hasta un nivel de deformación determinado. Para ello, se utilizan muestras normalizadas (probetas), y un equipo (generalmente un texturómetro) dotado de sistemas para fijar los extremos opuestos de las muestras, aplica las fuerzas de tracción (fuerzas normales iguales y divergentes que actúan sobre un mismo eje). En estos ensayos se regula la intensidad y velocidad de carga. Las probetas empleadas para el ensayo pueden ser de muy diferentes formas y su sección puede ser cilíndrica, cuadrada o rectangular. Los productos cárnicos suelen presentar un comportamiento mecánico similar a los plásticos, por lo que es más apropiado utilizar probetas de sección rectangular (Honikel, 1998). El comportamiento del material se recoge en las curvas de tensión-deformación, en las que se representa el alargamiento de las muestras frente a los esfuerzos aplicados (Figura I.15). En estas curvas, en el caso de materiales elásticos, se distinguen las zonas de deformación elástica, de fluencia, de deformación plástica, de estricción y el punto de rotura.

A lo largo de un ensayo de tracción (Figura I.15), ante una determinada carga, los esfuerzos se incrementan a medida que aumentan las distancias intermoleculares, y por tanto, con la deformación producida ( $\epsilon$ ). Si las fuerzas exteriores exceden ciertos valores propios de cada material, las fuerzas interiores no podrán equilibrarlas (tensión de rotura) y las distancias intermoleculares crecerán hasta que la cohesión desaparezca y el cuerpo se quiebre (punto de rotura). La tolerancia a la rotura, y el comportamiento hasta que ésta se presenta, varía de unos materiales a otros. Así,

cuando un alimento (por ejemplo, un tejido animal) se somete a una fuerza externa, la tensión interna que en él se crea, primero se absorbe dando lugar a una deformación. En algunos casos, cuando la carga cesa, el producto recupera su forma (*región elástica*). Esta región está relacionada con el estiramiento de los enlaces interatómicos y la deformación elástica de las macromoléculas. En algunos productos (en especial en los alimentos viscoelásticos) sólo puede producirse una recuperación parcial, porque la red tridimensional elástica se desintegra por la tensión interna (Muller, 1973).

Si la carga se incrementa, y el esfuerzo supera un determinado nivel crítico (límite de elasticidad), el alimento experimenta una deformación permanente (*deformación inelástica*, comenzando el *período plástico*) y una fuerza adicional muy pequeña puede producir un gran estiramiento. Si la carga se incrementa aún más, puede aumentar rápidamente el estiramiento (*región de ductibilidad*, en el período plástico). Ante el incremento de la carga, finalmente se supera la tensión de rotura y el alimento se rompe por líneas de debilidad. En estos ensayos se asume que la fractura de las muestras se produce en un plano perpendicular a la tensión aplicada.



**Figura I.15.** Curva característica de un ensayo de tensión-deformación.

No todos los materiales presentan las regiones indicadas. En algunos materiales es muy difícil determinar en qué momento se pasa del período elástico al plástico, dado que no existe un punto de fluencia bien marcado (por ejemplo, en productos con estructura no cristalina se produce una transición gradual). Se define la *carga límite de elasticidad* o *límite elástico* como aquella que provoca un alargamiento permanente mínimo (por debajo del 0,02%), mientras que la *carga límite de fluencia* es la que

provoca un alargamiento permanente (mayor del 0,2%). Dependiendo del perfil de las curvas de esfuerzo-deformación ( $\sigma$ - $\epsilon$ ), pueden distinguirse productos dúctiles (se alargan considerablemente tras su límite elástico), duros (elevada resistencia a la deformación o rotura), blandos (con pequeñas cargas sufren grandes deformaciones), resistentes (gran fuerza para romperse) y frágiles (se rompen justo después de excederse su límite elástico). Con el análisis detallado de las distintas regiones puede realizarse una calificación más amplia del material (por ejemplo, blandos, frágiles y quebradizos, que presentan punto de rotura con cargas de baja intensidad y sin deformarse, o por el contrario duros, resistentes y dúctiles, etc.). No obstante, en los alimentos por el carácter anisotrópico y heterogéneo de muchos de ellos (por ejemplo, alternando tejido muscular y graso), pueden presentarse distintos comportamientos y momentos de rotura, lo que dificulta la interpretación de los resultados y exige un especial cuidado en la preparación de las muestras y en el diseño del ensayo.

En la región de deformación elástica, las tensiones son proporcionales a los alargamientos unitarios de acuerdo con la ecuación que expresa la ley de Hooke:  $\sigma = E \epsilon$ , donde  $\sigma$  representa la tensión normal,  $\epsilon$  las deformaciones unitarias y  $E$  el coeficiente de proporcionalidad o *módulo de elasticidad* o *de Young*. Este módulo es, por tanto, la pendiente de la curva de tensión-deformación en la zona elástica ( $Tg \alpha = \sigma/\epsilon = E$ ) y corresponde a una medida de la rigidez del material (su resistencia a la deformación elástica). El módulo de Young difiere en cada material (Muller, 1973). Por otra parte, el módulo de Young decrece al incrementarse la temperatura, ya que la expansión térmica reduce el valor de  $dF/dS$  ( $F$ : fuerza aplicada al material;  $S$ : área transversal del material), lo que se manifiesta durante el tratamiento térmico.

En la zona elástica, las deformaciones se producen sin variación del volumen del material, es decir, si se modifica la longitud, las otras dos dimensiones también cambian (relación de Poisson). Cuando se estira un material, su anchura disminuye (aparecen tensiones y deformaciones en dirección perpendicular a la fuerza principal). La expresión de Poisson formula la relación entre la contracción lateral y la deformación longitudinal; su valor es normalmente de alrededor de 0,5. En el caso de frutas y tejidos vegetales, la relación de Poisson disminuye conforme aumenta el contenido en aire.

Dada la extensa información que puede obtenerse de un ensayo de tracción, se considera que es el más adecuado para estudiar el comportamiento mecánico de materiales (Purslow, 1985; Honikel, 1998; Bourne, 2002), así como su relación con la

estructura. Con este objetivo se utiliza ampliamente en diversas áreas (plásticos, resistencia de materiales para diversos usos, etc.). Sin embargo, en alimentos su uso es muy restringido, pese a que ofrezca información de gran interés y complementaria a la aportada por TPA y por otros ensayos mecánicos (como penetración, corte, torsión y flexión).

Al contrario que el TPA, los datos existentes en la bibliografía acerca del análisis de tensión son escasos y relativos a una variedad limitada de alimentos. Algunos autores han utilizado el ensayo de tracción para estudiar las propiedades reológicas de fibras musculares y de las miofibrillas antes, durante y después del *rigor mortis* y para analizar el efecto de la temperatura de cocción en las propiedades de la carne, fibras musculares aisladas y tejido conjuntivo (Purslow, 1985; Lepetit y Culioli, 1994; Lewis y Purslow, 1989; Mutungi y col., 1995, 1996; Egelandstad y col., 1996; Willems y Purslow, 1996; Christensen, y col. 2000). Más recientemente, también se han utilizado estos análisis para determinar los cambios de las propiedades de tensión mecánica de las fibras musculares en el almacenamiento post-mortem y en carne (Christensen, y col., 2003; Farouk, y col., 2005; Gillett y col., 2006).

## **I.6. ANÁLISIS ESTRUCTURAL**

La microscopía electrónica de barrido y la imagen de resonancia magnética nuclear son dos técnicas, que aunque basadas en principios muy distintos, aportan información estructural complementaria sobre la estructura de los alimentos. Ambas pueden relacionarse con el comportamiento reológico de los materiales y explicar las razones del mismo.

### **I.6.1. IMAGEN DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (IRM)**

En los últimos años, se ha producido un considerable avance en el estudio de la estructura de los componentes de los alimentos y de los cambios asociados al procesado que se debe, en gran medida, a la aplicación en el campo alimentario de técnicas de estudio que habitualmente se utilizaban en otras áreas (por ejemplo en el diagnóstico clínico). Entre estas técnicas, cabe citar la imagen de resonancia magnética nuclear (IRM). Se trata de una metodología no destructiva y no invasiva, que no



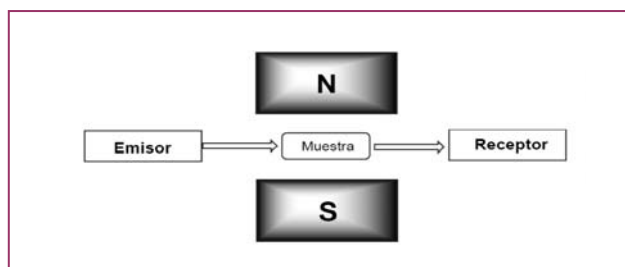
requiere preparación previa del material objeto de estudio. Está basada en el principio de la resonancia magnética nuclear (RMN) y permite obtener imágenes de distintas secciones internas de una muestra y aporta amplia información sobre su estructura.

Los fundamentos de la RMN fueron descritos por Bloch y Purcell, galardonados en 1952 con el Premio Nobel de Física por el desarrollo de nuevos métodos para la medida precisa de efectos magnéticos nucleares. A pesar de haber sido inicialmente descubierta en un ámbito físico, la tecnología RMN se ha utilizado extensamente desde finales de la década de 1940 para elucidar la estructura de moléculas en química orgánica y pronto se confirmó su potencial para el análisis de tejidos biológicos. Sin embargo, su aplicación en alimentos se retrasó debido a la escasez de expertos en la materia, el alto coste de los equipos y la ausencia de un marco de RMN específicamente diseñado para matrices alimentarias. En los últimos años, el desarrollo de instrumentación adecuada y la mejora de herramientas informáticas para recoger y analizar bases de datos ha facilitado su aplicación en el área de la Ciencia y Tecnología de los Alimentos.

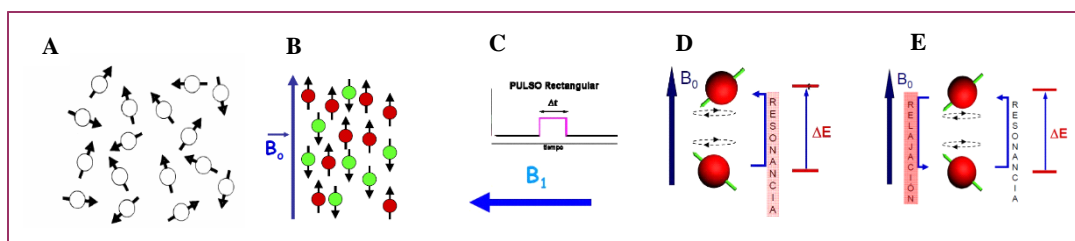
### 1.6.1.1. FUNDAMENTO DE LA RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

La RMN es un fenómeno físico por el cual los núcleos atómicos con un número impar de protones (Z) y/o un número impar de neutrones (N) (espín nuclear,  $I = \frac{1}{2}$ , no nulo) pueden absorber selectivamente energía de radiofrecuencia al ser colocados bajo la acción de un campo magnético (Figura I.16). Una vez que los núcleos han absorbido la energía de radiofrecuencia (*resonancia*), devuelven el exceso energético mediante la liberación de ondas de radiofrecuencia (*relajación*). Esta liberación energética induce una señal eléctrica en una antena receptora que permite obtener una imagen o hacer un análisis espectrométrico. Según estos principios, se distinguen distintas técnicas RMN que aportan una información amplia y variada sobre la estructura de distintas matrices y compuestos. Por una parte, la espectroscopía RMN permite la identificación de moléculas concretas y la observación de sus cinéticas a través de los cambios en intensidades de sus líneas espectrales. Mediante el uso de gradientes de campo magnético pueden obtenerse imágenes de los tejidos biológicos y conocer así la distribución espacial de las moléculas de agua en la muestra (Bertram, 2004). Entre los núcleos que presentan el fenómeno de resonancia magnética ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{23}\text{Na}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{15}\text{N}$ , etc.) el más importante por su abundancia en los tejidos biológicos es el  $^1\text{H}$  (protón).

Los equipos de RMN constan básicamente de un imán (con sus dos polos magnéticos, polo Norte [N] y polo Sur [S]), un emisor y un detector de radiofrecuencia (Figura I.16).



**Figura I.16.** Representación esquemática de un equipo de RMN.



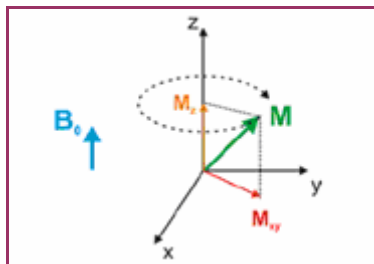
**Figura I.17.** Secuencia de un proceso de RMN. A: orientación al azar de espines.

B: aplicación de un campo magnético  $B_0$  y orientación de espines.

C: aplicación de un pulso de radiofrecuencia  $B_1$ . D: absorción de energía y entrada en resonancia. E: relajación nuclear.

La secuencia de la Figura I.17 es repetitiva, de manera que un experimento de RMN consiste en la aplicación sucesiva de pulsos de radiofrecuencia que conducen a la obtención de la señal final que se procesará para su análisis.

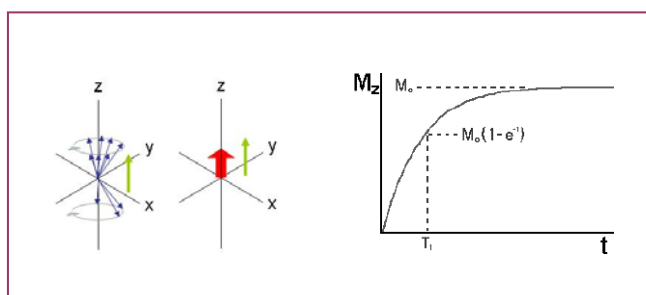
Cuando los núcleos entran en resonancia aparece un vector de magnetización ( $M$ ) orientado según la dirección del campo magnético, cuyo valor depende de la densidad de núcleos. El vector  $M$  tiene dos componentes: magnetización longitudinal ( $M_z$ ) y magnetización transversal ( $M_{x,y}$ ) (Figura I.18).



**Figura I.18.** Representación de la magnetización en el plano x, y, z.

Una vez retirada la energía de radiofrecuencia, la magnetización vuelve a su posición inicial mediante el proceso de relajación nuclear, que se verá muy influenciado por el entorno bioquímico en el que se encuentran los núcleos. La recuperación de la magnetización ocurre a nivel longitudinal y a nivel transversal:

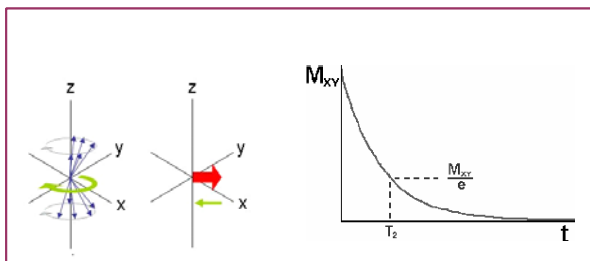
- a) *Relajación longitudinal*: los protones liberan progresivamente su exceso energético. Cuando el valor de la proyección sobre el eje longitudinal ( $M_z$ ) sea idéntico al valor inicial de  $M$ , la relajación habrá terminado (Figura I.18). El estudio de la relajación longitudinal,  $M_z$ , informa acerca de la rapidez con la que se alcanza de nuevo el estado inicial. La relajación longitudinal tiene la forma de una exponencial creciente regulada por una constante de tiempo, expresada en milisegundos, denominada constante de relajación longitudinal  $T_1$  (Figura I.19). Cuanto menor es el valor de  $T_1$ , más rápido se alcanza el estado de equilibrio, es decir, más rápida es la relajación.



**Figura I.19.** Representación de la relajación longitudinal  $T_1$ .

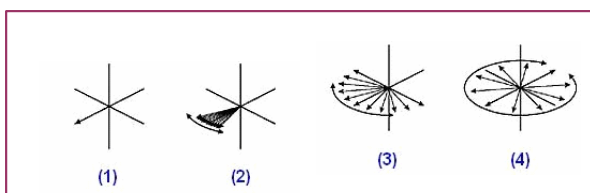
- b) *Relajación transversal*: las variaciones respecto al tiempo de la componente sobre el plano transversal x,y de la magnetización durante la relajación o relajación transversal ( $M_{x,y}$ ) aportan información relacionada con la estructura bioquímica del medio (Figura I.20). Cuando  $M_{x,y}$  es cero, los espines nucleares han alcanzado su orientación al azar. La variación de la relajación transversal

se representa por una exponencial decreciente regulada por la constante de relajación  $T_2$  expresada en milisegundos.



**Figura I.20.** Representación de la relajación transversal  $T_2$ .

Durante el pulso de radiofrecuencia todos los espines están en fase. Sin embargo, al retirar la energía, con el tiempo, se va perdiendo la coherencia, desfasándose progresivamente debido a las diferencias en los campos magnéticos que perciben los núcleos (Figura I.21).  $T_2$  se relaciona, por tanto, con la incoherencia o asincronismo de la liberación energética nuclear.



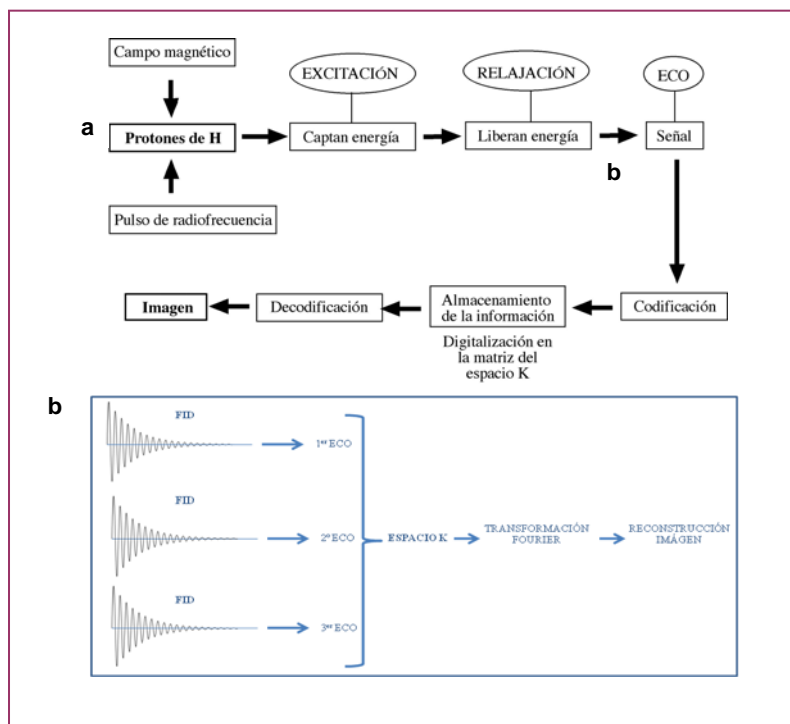
**Figura I.21.** Evolución de la proyección de los espines sobre el plano transversal después de un pulso de radiofrecuencia.

#### I.6.1.2. PROCESADO Y OBTENCIÓN DE IMÁGENES DE RMN

La relajación nuclear retorna al detector como una señal sinusoidal amortiguada o FID (*Free Induction Decay*). Para cada pulso de radiofrecuencia aplicado se obtendrá una FID. Cada una de las FID se corresponde con un ECO (Figura I.22). El conjunto de ECOs obtenidos durante el experimento se conoce como espacio K. A partir de los datos del espacio K, mediante un proceso matemático denominado transformación de Fourier, sensible a la amplitud, secuencia y fase, se reconstruye sobre una escala de grises el valor de la señal en el píxel correspondiente (Figura I.22).

El valor numérico de cada píxel se obtiene de la señal de la unidad de volumen elemental, *voxel* (3D) (Fantazzini y col., 2009). La intensidad de la señal procedente de

cada *voxel* depende de la concentración de núcleos de  $^1\text{H}$  (densidad protónica), tiempos de relajación de las componentes longitudinal (constante de tiempo  $T_1$ ) y transversal (constante de tiempo  $T_2$ ) del vector de magnetización, así como del tipo de secuencia de pulsos y los parámetros utilizados (Duce y col., 1994; Mitchell y col., 2001). De cada *voxel* se puede obtener información sobre los parámetros ligados a la estructura y movilidad molecular ( $T_1$  y  $T_2$ ) y acerca de la facilidad de difusión del agua (coeficiente de difusión aparente o ADC).



**Figura I.22.** Representación esquemática del proceso de obtención de una imagen de RMN.

<sup>a</sup> Sólo se regeneran señales en las zonas donde hay protones ( $^1\text{H}$ ) [Lípidos ( $-\text{CH}_2 - \text{CH}_3$ ),  $\text{H}_2\text{O}$  libre o ligada]

<sup>b</sup> Procedimiento de reconstrucción de imágenes IRM

## I.6.2. MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)

La posibilidad de observar muestras íntegras en sus tres dimensiones mediante la microscopía electrónica se desarrolló con la aparición del microscopio electrónico de barrido en el año 1965, aunque los conceptos básicos para este tipo de microscopía ya habían sido establecidos por Knoll en 1935. Desde entonces, la MEB ha avanzado vertiginosamente convirtiéndose en una poderosa herramienta que permite la caracterización estructural de diversos tipos de materiales. Actualmente, se utiliza con

frecuencia en Ciencia y Tecnología de Alimentos para observar, analizar y explicar fenómenos que ocurren a nanoescala. Las imágenes obtenidas aportan información acerca de las características morfológicas y topográficas detalladas de las superficies. Por ello, es muy útil para estudiar la microestructura de matrices miofibrilares heterogéneas. En este sentido, se han hecho estudios relacionados con la influencia de la microestructura en la calidad final de la carne (Gordon y Barbut, 1992; Katsaras y Budras, 1992, 1993; Taylor y col., 1995; Chiung y col., 1996; Larrea y col., 2007; Silva y col., 1993), actividad proteolítica y transformaciones *post-mortem* (Aguilera y Stanley, 1999), e incluso cambios proteicos durante el procesado (Toldrá y Aristoy, 1993; Gil y col., 1999; Larrea y col., 2006).

#### I.6.2.1. FUNDAMENTO DE LA MEB

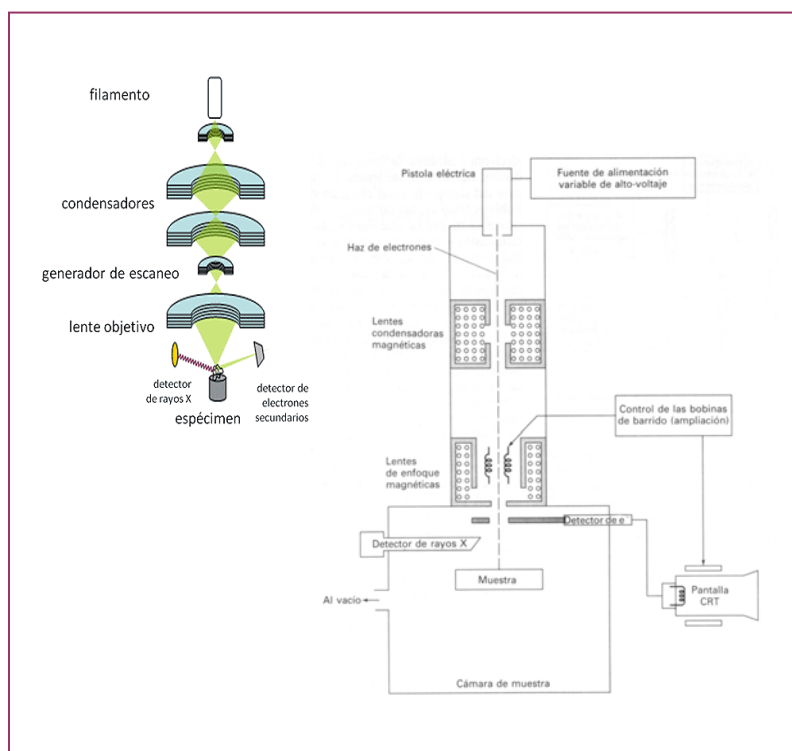
El fundamento de la MEB radica en que los electrones emitidos por un cátodo de tungsteno pasan a través de una cámara en la que previamente se ha hecho el vacío (entre  $10^{-2}$  y  $10^{-5}$  Pa). En ella, el haz inicial se concentra merced a una serie de lentes electromagnéticas de forma que su diámetro va disminuyendo (Figura I.23). Este haz electrónico concentrado (con energías desde unos cientos de eV hasta 50 KeV) se desplaza sobre la superficie de la muestra a analizar con continuas idas y venidas. Este movimiento de barrido del haz se consigue gracias a un sistema de bobinas. En la interacción del haz electrónico con la superficie se producen electrones secundarios y electrones retrodispersados que contribuyen a la amplificación de la corriente. Estos electrones, finalmente, son conducidos a un detector que permite la posterior representación gráfica en forma de imagen. Existe una correspondencia biunívoca (punto a punto) entre la muestra a examinar y la imagen formada, la cual informa sobre la apariencia tridimensional del material en estudio.

La técnica requiere la preparación previa de la muestra. Para ello, primero es necesario su deshidratación, después puede recubrirse con una fina capa de carbono (en el caso de realizarse un análisis por rayos X) y finalmente, para hacerla conductora, con un metal pesado, como el oro.

### 1.6.2.2. DETECTORES UTILIZADOS EN MEB

Para la obtención de imágenes de MEB pueden utilizarse tres tipos de detectores: de electrones secundarios, de electrones retrodispersados y de energía dispersiva.

El primero de ellos, permite obtener imágenes de alta resolución (Secondary Electron Image, SEI) que se producen por choques inelásticos de los electrones cuando uno de ellos pasa muy cerca del núcleo de un átomo de la muestra, proporcionando la suficiente energía a uno o varios de los electrones interiores para desplazarse fuera de la muestra. Estos electrones son de muy baja energía (por debajo de 50 eV), por lo que deben encontrarse muy cerca de la superficie para poder liberarse. La imagen que se obtiene es tridimensional y aporta amplia información topográfica de la muestra, por lo que es el tipo de imagen de microscopía más utilizada.



**Figura I.23.** Esquema de un microscopio electrónico de barrido.

Adaptado de Skoog y col. (2001).

El detector de electrones retrodispersados permite la obtención de imágenes de composición y topografía de la superficie (Backscattered Electron Image, BEI). Los electrones retrodispersados se producen cuando un electrón del haz colisiona con el núcleo de un átomo de la muestra, siendo repelido (reflejado) en sentido contrario, es

decir, hacia fuera de la muestra. Se trata de una respuesta a colisiones elásticas. La intensidad de dicho efecto varía proporcionalmente con el número atómico de la muestra, así los átomos más pesados producen mayor cantidad de electrones retrodispersados. Por esta razón, se utilizan para obtener información sobre la composición superficial de la muestra.

La intensidad de ambas emisiones varía en función del ángulo que forma el haz incidente con la superficie del material, es decir, depende de la topografía de la muestra.

Finalmente, el detector de energía dispersiva (Energy Dispersive Spectrometer, EDS) analiza los rayos X emitidos por pequeñas áreas ( $1 \text{ mm}^2$ ) de la muestra cuando el haz de electrones incide sobre ellas. Este detector permite realizar diversos análisis cualitativos de los constituyentes mayoritarios y minoritarios, y aporta información de la distribución de elementos. La precisión de un análisis cuantitativo, normalmente, es mayor del  $\pm 2\%$  y los límites de detección están alrededor de las 100 ppm en análisis rutinarios, llegando a ser de 10 ppm en circunstancias excepcionales.





## II. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO Y OBJETIVOS



## II. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

España ocupa el primer lugar en el mundo en la elaboración y consumo de jamones curados. Considerado “el rey” de los productos cárnicos sometidos a fermentación y/o maduración, la producción de jamones, junto a la de paletas curadas, alcanzó el máximo en 2008 con 271.900 Tm y, probablemente debido a la crisis económico-financiera, se produjo un ligero descenso en los tres años siguientes, alcanzando en 2011 la cifra de 255.000 Tm, lo que aproximadamente permite deducir que se producen en España alrededor de 30 millones de unidades anuales. Se estima que la facturación industrial (entre fabricante y primer cliente) del subsector de jamón curado en su conjunto (ibéricos, serranos y convencionales) se eleva a unos 2.300 millones de euros anualmente. Es, por tanto, un pilar fundamental de la industria agroalimentaria española. Los jamones curados de cerdo blanco representan algo más del 80% de las ventas en volumen y en valor, mientras el mercado de jamones Ibéricos se mantiene en cuotas en torno a un 20 %.

En la geografía española se localizan varios núcleos de producción tradicional y particular de jamones curados, que ha dado lugar a diversas “Denominaciones de Origen” y a la certificación de “Especialidad Tradicional Garantizada” de “Jamón Serrano”, que garantiza una mayor calidad y precio que los convencionales no acogidos a esta designación. No obstante, estos últimos son los que alcanzan la mayor cuota de mercado, es decir, los jamones curados de producción industrial sin ningún tipo de calificativo adicional.

La industria jamonera en España es muy heterogénea y presenta todavía importantes niveles de atomización, aunque los diez principales grupos engloban el 40% de la producción total.

La elaboración de jamones curados es factible a partir de perniles enteros o de porciones. El producto resultante puede presentarse de distintas formas. En España, la comercialización de la extremidad posterior en el caso del jamón, o de la anterior en el de la paleta, integras (incluyendo pezuña) es típica de los productos Ibéricos, de los Serranos y de algunas denominaciones de origen. En Italia lo es en el jamón de San Danielle y en China en el Jinhua ham. Sin embargo, el jamón de Parma, así como la mayoría de los jamones destinados al deshuesado, se les elimina el extremo distal (sin pezuña). Para la fabricación de otros jamones como *d’Ardennes*, el *culatello* y el *fiocchetto* en Italia o el de Bayona se utilizan porciones de perniles.

Aunque en nuestro país, de forma tradicional, el jamón curado se comercializa como pieza entera (con o sin pezuña), en los últimos tiempos, el incremento de la demanda de los productos “listos para su consumo”, ha llevado a una considerable expansión del mercado del producto loncheado o cortado en porciones de mayor o menor tamaño, que generalmente se distribuyen envasados a vacío.

En el mercado interior, se estima que un 53,5% de la comercialización de jamón curado es por piezas y el resto corresponde a las ventas por centros de piezas, porciones, lonchas, tacos y tiras. Las ventas en el exterior fueron en 2012 de 26.706 Tm, lo que supuso alrededor de un 15 % del total de las ventas del sector frente a un 6 % que se vendía hace unos cinco años. El importe total de producto exportado alcanzó los 238 millones de euros. Del total de las ventas, el 26,4% son piezas con hueso, y 73,6% restante es producto deshuesado en porciones de diverso tamaño. En 2012, el principal destino de los jamones curados españoles fueron a la par Alemania y Francia con, respectivamente, el 27,2 y 25,9 %, de la venta total, seguidas a gran distancias de Portugal con el 9,2 % y Bélgica e Italia con el 4,1 y 3,9 %, respectivamente. La exportación de jamón a otros países (México, Holanda, Noruega, Estados Unidos, Reino Unido, Japón, Argentina, Dinamarca, Chile, Australia, Suecia, Rusia, Suiza y Brasil) alcanzó el montante de 5.211,5 Tm (entre 770,2 Tm para México y 260 Tm para Suiza), lo que representa un 19,5 % del total exportado. El porcentaje restante, se distribuye entre otros muchos países con niveles inferiores a 187 Tm (por ejemplo, Venezuela).

Analizando estos últimos datos, es evidente la importancia cuantitativa y la clara expansión de la comercialización de jamones curados deshuesados como piezas enteras, en porciones o en lonchas. En la aceptación de esta presentación se encuentran implicados diversos factores entre los que cabe mencionar:

- La disposición de piezas de geometría más regular y aspecto más homogéneo.
- Una imagen más estética, especialmente para la exportación. En muchos países, no se acepta de buen grado un producto cárnico que mantiene la conformación del pernil, con la presencia de pezuña, restos vellosos y mohos superficiales que caracterizan a las piezas de jamón enteras.
- Facilita el corte al detallista. Posibilita un corte rápido con máquina a medida que se consume o se vende. Esta forma de presentación resulta de gran utilidad en centros comerciales para el consumo doméstico.

- Eliminación de problemas relacionados con la presencia de hueso como coquera, defectos de “cala”, etc.

Cabe añadir, que el avance del envasado a vacío ha contribuido favorablemente a mejorar la imagen y seguridad higiénica de estos productos.

En la actualidad, se está elaborando jamón deshuesado curado fundamentalmente por tres procedimientos. El más extendido consiste en extraer los huesos al final de la maduración. Las piezas resultantes se comprimen (80-100 kg/cm<sup>2</sup>) para darle una forma más o menos de paralelepípedo que facilita su envasado y permite un loncheado regular. Otro procedimiento consiste en deshuesar a mitad de maduración para facilitar la operación de extracción de las porciones óseas y la conformación de las piezas. Para proseguir la maduración, esta técnica requiere la conformación de las piezas y el sellado de las oquedades resultantes del deshuesado con diversos materiales (grasa, ceras, etc.). Recientemente, algunas industrias están realizando el curado de perniles deshuesados en fresco con considerables modificaciones del proceso convencional.

A pesar de que están empleándose estos tres procedimientos, las industrias del sector no consideran que la elaboración de jamones deshuesados curados esté totalmente resuelta. El procedimiento de la separación de huesos al final de la maduración permite obtener una buena calidad de producto pero requiere disponer de personal y medios especializados. Por otra parte, reduce considerablemente el rendimiento del proceso al “curarse” y la falta de un buen aprovechamiento del producto dado el material que necesariamente hay que desechar. El deshuesado a mitad de la maduración tiene inconvenientes similares al método anterior, a los que hay que añadir la necesidad de aislar las oquedades para evitar la difusión de la abundante microbiota externa existente de forma natural. El deshuesado en fresco de los perniles es el último proceder que se ha introducido en la industria, en él se recurre al salado, prensado y a la capacidad funcional de las proteínas miofibrilares para el conformado de las piezas. Requiere modificaciones notables del salado y secado y el producto resultante no tiene elevada calidad.

Estos antecedentes motivaron a la autora de esta tesis a plantear el trabajo de investigación que se recoge en la misma con el ***objetivo principal*** de ***evaluar la eficacia de distintos agentes de ligazón en frío para la reestructuración de perniles deshuesados en fresco destinados a la elaboración de jamón curado.***

La hipótesis de partida que sustentó la propuesta fue que algunos componentes no cárnicos (agentes de ligazón en frío) establecen interacciones estables con proteínas miofibrilares y del estroma que les convierte en verdaderos elementos de “unión” entre porciones cárnicas. Estos sistemas se habían utilizado previamente para elaborar productos reestructurados a partir de porciones pequeñas de carne fresca y para mejorar la estabilidad, textura y consistencia de geles cárnicos y de pescado, en ambos casos con gran éxito. Basándose en estas referencias, se supuso que un procedimiento similar podría conducir a afrontar el manejo y procesado de porciones de carne de tamaño considerable, exentas de fracciones óseas, como es el caso de los perniles deshuesados.

El desarrollo y consecución del objetivo planteado en este trabajo, de tener éxito, supondría una nueva alternativa basada en la actividad de agentes de ligazón en frío para elaborar jamones deshuesados, desde el inicio del proceso de elaboración. Dichos agentes permitirían, tras el deshuesado, unir las superficies cárnicas derivadas de la extracción de la estructura ósea, evitando la existencia de fisuras, grietas y oquedades, lo que resultaría en una conformación de la pieza con la suficiente *consistencia* como para someterse a operaciones de salado, secado y curado, en un proceso próximo a la de elaboración convencional de jamones curados.

Las investigaciones recogidas en esta Tesis Doctoral se han desarrollado en un marco amplio de trabajo en el que se diferencian tres etapas, en la última de las cuales se abordó el objetivo principal, tras un estudio inicial del comportamiento reológico de distintos productos cárnicos comerciales y el análisis de las propiedades mecánicas y estructurales de miosistemas gelificados en frío con distintos agentes de ligazón. En estas etapas se afrontaron los siguientes **objetivos parciales**:

1. Determinar el comportamiento reológico de productos cárnicos comerciales en ensayos de tracción y estudiar su correlación con parámetros derivados del análisis del perfil de textura y características físico-químicas.
2. Analizar el comportamiento mecánico de distintos tejidos de jamón curado.
3. Establecer las condiciones de trabajo en ensayos de tracción para determinar la fuerza de ligazón en productos reestructurados.

4. Analizar las modificaciones de las características reológicas de sistemas cárnicos modelo al adicionar derivados del plasma sanguíneo y transglutaminasa de origen microbiano (MTGasa) como agentes de ligazón en frío.
5. Conocer las características estructurales de miosistemas tratados con derivados del plasma sanguíneo y MTGasa.
6. Estudiar la relación entre características reológicas y estructurales de miosistemas tratados con derivados del plasma sanguíneo y MTGasa.
7. Estudiar el efecto de diversas variables del proceso de elaboración de jamón en los parámetros de ligazón (fuerza y velocidad de ligazón), primero en complejos cárnicos modelo y, posteriormente, en perniles reestructurados sometidos a curación.
8. Analizar la microestructura de las áreas de unión entre superficies cárnicas en productos reestructurados.

En resumen, el trabajo se planificó para abordar objetivos de carácter científico y técnico. Por una parte, se pretendía incrementar el conocimiento existente sobre las propiedades reológicas de productos cárnicos, incluido el jamón curado. Esta parte del trabajo, permitiría además realizar un planteamiento más adecuado de las características que deberían alcanzarse en los jamones reestructurados con agentes de ligazón en frío. Para una mejor comprensión de los mecanismos de reestructuración de los productos cárnicos, se pensó en la imagen de resonancia magnética como una técnica no destructiva que permitiría estudiar los cambios estructurales y en la microscopia electrónica de barrido, como metodología de referencia para estudiar las áreas de interacción de superficies cárnicas y agentes de ligazón en frío. De otro lado, se consideró la necesidad de establecer las condiciones de procesado para la elaboración de jamón curado a partir de perniles deshuesados reestructurados en frío. De conseguirse, sería un importante avance que podría transferirse a la industria cárnica, en aras de aportar una nueva forma de producción de este producto cárnico, con la esperanza de que la aceptación del mismo por los consumidores adquiriese una senda creciente, en especial en el mercado exterior.

El trabajo realizado se ha desarrollado al amparo de los proyectos de investigación AGL2004-06773/ALI, AGL 2010-19158/ALI, CARNISENUSA (CSD2007-00016, incluido en CONSOLIDER-INGENIO 2010) del Ministerio de Educación y Ciencia



y CCG07-UCM/AGR-2640 y TEMINYSA (S-0505/AGR-0314) de la Comunidad de Madrid.

### III. MATERIAL Y MÉTODOS



### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### III.A. MATERIAL

##### III.A.1. MATERIAL GENERAL DE LABORATORIO

El agua destilada utilizada se obtuvo en un aparato Millipore Elix 3, que funciona por ósmosis inversa y proporciona un agua purificada de tipo II de calidad constante y fiable, con una resistividad del orden de 15 M $\Omega$ .

Todo el material de vidrio empleado en el trabajo experimental que se describe en esta memoria fue de la marca Pyrex® (vasos de precipitados, pipetas de vidrio, probetas, matraces Erlenmeyer, tubos de centrifuga, tubos Kjeldahl, etc).

Las pesadas ordinarias se realizaron en balanzas monoplato AND mod. FX-320, y KERN mod. 440-33 y mod. 449-35N y las de precisión en balanza analítica AND mod. HR-120.

La homogeneización de las muestras, para la realización de las correspondientes determinaciones químicas, se efectuaron en unos homogeneizadores Polytron mod. PT 10-35 y Ultra Turrax mod. T25 basic.

La carne, los productos cárnicos y todos los productos empleados como sistemas de ligazón, así como las disoluciones y preparados que no pueden permanecer a temperatura ambiente se conservaron en arcones de congelación Liebherr y en frigoríficos Sanyo, Medicoool, Philco, Fagor, Electrolux y Kelvinator.

Las medidas de pH se realizaron en un micro pH-metro Crison Digital 501 mod. 2001 (Crison Instruments Ltd., Barcelona, España) equipado con un electrodo de vidrio.

El hielo en escamas empleado para el mantenimiento de las muestras a temperaturas bajas se obtuvo de una máquina Scotsman mod. AF-10.

Las disoluciones se prepararon en placas de agitación magnética Selecta mod. Agimatic N, Bunsen mod. MC-8 y Thermolyne mod. Nuova II, dotados con calefacción por si fuera necesario utilizarla.

Las pipetas automáticas empleadas fueron Discovery Comfort autoclavable HTTP de 20-200  $\mu$ L, de 100-1000  $\mu$ L y de 1-5 mL.

Las cucharas, espátulas y tijeras utilizadas fueron de acero inoxidable.

La concentración de volúmenes de disolventes orgánicos relativamente grandes se realizó en un rotavapor Büchi mod. EL acoplado a un baño calefactor y a una bomba de vacío Eyela mod. A-3S. Sin embargo, los volúmenes pequeños se evaporaron mediante corriente de nitrógeno.

La filtración de las muestras se realizó utilizando filtros Whatman 125 y Millipore FH 0,5  $\mu\text{m}$ .

Los desecadores, donde se mantuvieron las muestras hasta su visualización en el microscopio óptico de barrido una vez sometidas a desecación mediante punto crítico, fueron Pyrex®.

Las centrifugaciones de los extractos de las muestras cárnicas se realizaron en centrífugas Sorvall mod. RC-5B equipadas con rotores mod. GSA, GS3 y S600, y Orto-Alresa mod. Digicen 20.

La actividad de agua,  $a_w$ , se determinó empleando un higrómetro de punto de rocío Decagon CX-1 (Decagon Devices, Inc., Pullman, WA, USA) junto con las cápsulas suministradas por el fabricante.

La determinación de la capacidad de retención de agua fue realizada empleando unas placas de metacrilato con tornillos para ejercer presión y papel Whatman No.1, 125 mm. El planímetro para la lectura de las áreas fue Planimeter Koizumi Type KP-27 Compensating.

El calibre utilizado para medir las dimensiones de las probetas de ensayo para los análisis reológicos fue un pie de rey digital Tesa mod. Shop-Cal con accesorios Brown and Sharpe Centerline (Tesa, Suiza).

La deshidratación de las muestras para la determinación de la humedad tuvo lugar en una estufa Heraeus mod. T6200 a una temperatura de 110 °C y en un desecador a vacío con gel de sílice activado.

La reducción de las muestras a cenizas se realizó utilizando un horno mufla de la marca Heraeus mod. M170, a una temperatura de 550 °C, donde se introduce la muestra en cápsulas de porcelana de la marca Pobel.

La determinación de la proteína se realizó mediante la determinación de nitrógeno total por el método de Kjeldahl. Las muestras se trataron en un digestor Kjeldahl Büchi Digestion Unit K-435 acoplado a una bomba Büchi Switzerland, que recogía los gases producidos durante el proceso de digestión.

La neutralización y destilación de las muestras digeridas se efectuó en un destilador Kjeldahl Büchi Distillation Unit B-324.

### III.A.2. REACTIVOS Y DISOLVENTES

Todos los productos químicos utilizados en las experiencias que se describen en esta memoria fueron de calidad reactivo, suministrados por las marcas Merck, Panreac, Fluka y Sigma.

### III.A.3. MATERIAL CÁRNICO

Las porciones cárnicas procedentes de perniles de cerdo blanco, estaban constituidas por fracciones de los músculos *quadriceps femoris*, *biceps femoris*, *semimembranosus* y *semitendinosus*, así como perniles enteros de cerdo blanco deshuesados en fresco suministrados siempre por el mismo establecimiento cárnico, a las 48 horas post-mortem.

Los embutidos fermentados y los productos cárnicos cocidos empleados para la caracterización de sus parámetros reológicos, así como los jamones D.O.P. Teruel fueron adquiridos en establecimientos comerciales de alimentación. Los productos fermentados y el jamón curado se mantuvieron 48 h almacenados a  $15 \pm 1$  °C, y los productos cocidos se almacenaron en refrigeración ( $4 \pm 1$  °C) el mismo tiempo.

### III.A.4. PRODUCTOS EMPLEADOS COMO AGENTES DE LIGAZÓN EN FRÍO

Se han empleado los siguientes agentes:

- a) Sistemas enzimáticos. Se ha utilizado transglutaminasa (E.C. 2.3.2.13) de origen microbiano (*Streptoverticillium mobaraense*) suministrada por Ajinomoto Co., en dos preparados comerciales ACTIVA® EB y ACTIVA® WM.

b) Derivados del plasma sanguíneo. Se han empleado dos productos suministrados por Sonac B.V. (Loenen, Holanda) que se comercializan con las siguientes denominaciones:

- Fibrimex®: constituido por dos soluciones congeladas, una de fibrinógeno (F) y otra de trombina (T) con las siguientes características:

<u>Concentrado de fibrinógeno</u>	<u>Trombina</u>
proteína: 9,5 % p/p	actividad enzimática: 18 - 20 NIH/mL
fibrinógeno: 5,0 - 5,6 % p/p	calcio 2,2 - 2,4 % p/p
extracto seco: 11 % p/p	
citrato: 0,5 % p/p	
grasa: 0,3 % p/p	

En esta memoria, las mezclas de fibrinógeno y trombina se han denominado sistema fibrinógeno-trombina (FT).

- Plasma Powder FG Porcine: producto deshidratado elaborado en polvo a partir de plasma sanguíneo de origen porcino y enriquecido en fibrinógeno (70 -80 % de proteínas de las cuales hasta un 4 % pueden ser de fibrinógeno). En esta memoria, este producto se ha denominado proteínas de plasma sanguíneo (PP).

### III.A.5. MATERIAL GENERAL PARA LA PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS CÁRNICAS

Los guantes anticorte de malla metálica (acerada) utilizados para cortar o lonchear las piezas cárnicas estaban provistos de una correa en el puño, que permitía su ajuste, eran ambidiestros de la marca Stahlnetz y adecuados para la industria cárnica y mataderos, diseñados siguiendo las instrucciones del RD1407/1992, según las Normas UNE-EN 420:1995 y UNE-EN 1082-1:1996.

Los cuchillos empleados para la limpieza, corte, manipulación y manejo de las porciones de carne y de los productos cárnicos fueron cuchillos profesionales de acero inoxidable de 21 cm de hoja, de la marca Manager mod. Soligen.

Las tablas de corte que se utilizaron como base para la realización de los cortes fueron tablas homologadas y aptas para uso alimentario fabricadas con polietileno de

uso alimentario de diferentes dimensiones (25 cm x 15 cm, 40 cm x 25 cm). También se utilizó una mesa de trabajo de acero inoxidable provista en los laterales más largos de una tira de 31,5 cm de ancho de material de polietileno para poder realizar cortes directamente sobre ella, que se encuentra en la Planta Piloto, Profesor Lorenzo de la Hoz Perales, del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

El corte de los productos cárnicos con el grosor deseado en cada ensayo, se realizó con una loncheadora eléctrica Beckers Italy mod. SP 300 CE DOM (Italia).

La carne empleada para la elaboración de las emulsiones cárnicas se trituró en una cortadora (*cutter*) Robot Coupe R 8 V.V. (Vincennes Cedex, Francia).

Para el envasado de las muestras a vacío, se utilizó una envasadora de alto vacío de la marca Vapta, mod. 750/400 (Vapta, S. L., Madrid, España). Este equipo permitió realizar en el interior de las bolsas un vacío de hasta 20 kPa. Se emplearon bolsas de plástico procedentes de dos distribuidores diferentes:

- de vacío suministradas por Cryovac® (Cryovac, Sealed Air, Barcelona, España) de tres tamaños diferentes: 120x250, 180x300 y 400x600 mm, multilámina, constituidas por poliamida/polietileno-etileno/copolímero basado en acetato de vinilo y con un espesor de 48 µm.
- de vacío termorretráctiles suministradas por Plastiñi (Plastiñi, Plastinal S.L., Arrubal, La Rioja, España) de dos tamaños diferentes: 250x350 y 380x700 mm, constituidas por poliamida/copolímero de polietileno y con un espesor de 60 µm.

Ambas bolsas fueron de baja permeabilidad, presentando un coeficiente de 35 cm<sup>3</sup>/24 h m<sup>2</sup> bar para el oxígeno y 150 cm<sup>3</sup>/24 h m<sup>2</sup> bar para el dióxido de carbono.

Para el salazonado de los perniles y modelos cárnicos se utilizó una cámara frigorífica de obra que se encuentra en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, dotada con circulación forzada de aire, generando corrientes que facilitan el secado de las piezas cárnicas. Para este fin, se empleó una mezcla al



50% de sal refinada de mesa y sal refinada marina a la que fueron incorporadas 200 ppm de  $\text{KNO}_3$  y 100 ppm de  $\text{NaNO}_2$ .

El primer período de la fase de secado se realizó en una cámara de maduración Ibercex mod. G-28 (ASL, San Fernando de Henares, España) dotada de control de la temperatura y la humedad relativa.

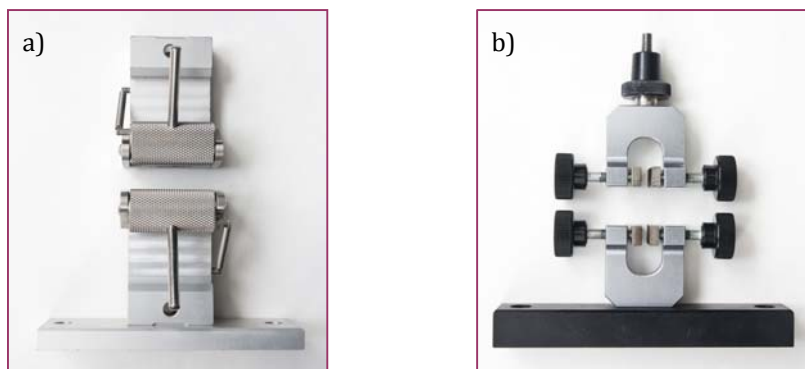
### III.A.6. MATERIAL EMPLEADO PARA EL ANÁLISIS REOLÓGICO

El análisis de perfil de textura (TPA) y el ensayo de tracción se realizaron con un texturómetro TA.XT2i Stable Micro System Texture Analyzer (Stable Microsystems Ltd., Surrey, Inglaterra) suministrado por Aname, S.L. y controlado desde un ordenador Pentium II mediante el programa Texture Expert versión 1.11 o Texture Exponent 32 versión 5.0.6.0.

Para la realización de estos ensayos se utilizaron células de carga de 5 y 25 kg. La calibración de fuerzas de la célula de carga de 5 kg se realizó con una pesa de 2 kg. Para la célula de carga de 25 kg, la pesa utilizada fue de 5 kg.

#### III.A.6.1. ENSAYO DE TRACCIÓN UNIAXIAL DESTRUCTIVO

Para la realización de los ensayos de tracción se utilizaron pinzas de aluminio, excéntricas A/TGT y de mordaza de sujeción paralela A/MTG (Figura III.1).



**Figura III.1. a)** Pinzas de cierre excéntrico A/TGT.

**b)** Pinzas de mordaza A/MTG.

### III.A.6.2. ANÁLISIS DEL PERFIL DE TEXTURA

Para la realización del análisis de perfil de textura (TPA) fue utilizada la prueba de doble compresión y para ello se empleó una sonda de presión con base plana de forma cilíndrica, de aluminio de 25 mm de diámetro mod. P/25 asociada a una plataforma de aluminio mod. HDP/90 donde fueron colocadas las muestras para el análisis.

### III.A.7. MATERIAL UTILIZADO PARA DETERMINAR LA MICROESTRUCTURA DE LAS MUESTRAS MEDIANTE IMAGEN DE RESONANCIA MAGNÉTICA

El análisis de las muestras mediante imagen de resonancia magnética (IRM) fue realizado en un espectrómetro Bruker BIOSPEC 47/40 (Bruker GmbH, Ettlingen, Alemania) horizontal que opera a 4,7 Teslas (200 MHz), equipado con un sistema de gradientes apantallado de 12 cm de diámetro que permite un gradiente de 200 mT m<sup>-1</sup>.

Este equipo se encuentra en el CAI de Resonancia Magnética Nuclear y de Espín Electrónico de la UCM.

### III.A.8. MATERIAL UTILIZADO PARA DETERMINAR LA MICROESTRUCTURA DE LAS MUESTRAS MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Los equipos empleados en este estudio se encuentran en el ICTS Centro Nacional de Microscopía Electrónica. Para llevar a cabo la deshidratación de las muestras se utilizó un secadero por punto crítico Balzers CDP-030. Después, fue necesario evaporar las muestras en el evaporador Balzers SCD-004 Sputter Coater, recubrirlas con grafito en un equipo Mini deposition System MED 010 Balzers y metalizarlas con oro (Emitech K550x Sputter Coater) (25 mA, 4 minutos) para hacerlas conductoras y poder visualizarlas posteriormente en el microscopio electrónico de barrido (JEOL mod. JSM 6400, Japón).

### III.B. MÉTODOS

#### III.B.1. PREPARACIÓN DE LOS SISTEMAS DE LIGAZÓN

##### III.B.1.1. TRANSGLUTAMINASA DE ORIGEN MICROBIANO (MTGasa)

La preparación del agente de ligazón MTGasa, para su aplicación a las superficies cárnicas de los modelos cárnicos y de los perniles, se realizó directamente en forma de polvo o en solución acuosa al 10 y 20 % (p/v) con una cantidad de NaCl que osciló entre 0 y 3 % (p/v).

##### III.B.1.2. SISTEMA FIBRINÓGENO-TROMBINA

Previamente a su mezcla, las soluciones de fibrinógeno y trombina fueron descongeladas y atemperadas ( $\sim 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Las proporciones de fibrinógeno y trombina ensayadas han sido: 10/1 y 20/1 (F/T, v/v). Las mezclas se prepararon inmediatamente antes de su uso y fueron utilizadas en los primeros 15 minutos para evitar la formación de la red de fibrina. Cuando se utilizó para unir dos piezas cárnicas, la aproximación de las superficies se hizo inmediatamente después de la aplicación de la mezcla de FT. Para elaborar emulsiones se mezcló con la pasta fina, se homogeneizó seguidamente y se introdujo rápidamente en los moldes que se iban a utilizar para la gelificación.

Se prepararon geles de fibrina mezclando fibrinógeno y trombina en la proporción 10/1 (v/v). En estos geles se estudió el efecto de las siguientes variables:

- Temperatura de gelificación. Las mezclas de FT se mantuvieron a 0, 6 y  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.
- pH de las mezclas. Para conseguir un determinado valor de pH en las mezclas de FT, se procedió al ajuste del mismo en los concentrados de fibrinógeno con HCl 0,5 M hasta valores de 5, 6, 7 y 8 y a continuación se adicionó la trombina.
- Concentración de NaCl en las mezclas. Se utilizaron concentraciones de 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 10 y 20 % de NaCl. La preparación de estas muestras consistió en disolver en 100 mL de la solución de fibrinógeno la cantidad necesaria de NaCl (FT/ NaCl, v/w) para que la mezcla final presentara dicha concentración de la sal, y posteriormente se añadieron 10 mL de trombina.
- Tiempo de gelificación. Todas las mezclas anteriores de geles de fibrinógeno-trombina fueron almacenadas en las condiciones indicadas durante un tiempo que varió desde 0 hasta 48 horas. La primera medida se realizó 35 minutos

después de la realización de la mezcla, durante las 6 primeras horas se fueron realizando análisis cada 30 minutos, desde las 6 hasta las 24 horas los análisis se efectuaron cada hora y a partir de este momento las muestras fueron tomadas a intervalos de cuatro horas.

### III.B.1.3. PROTEÍNAS DEL PLASMA SANGUÍNEO DESHIDRATADAS

Las proteínas del plasma sanguíneo deshidratadas empleadas para el trabajo experimental de la presente Tesis doctoral se han utilizado en polvo y rehidratadas en agua destilada o en solución salina conteniendo un 0,5, 1,5 y 3 % de NaCl (p/v). La proporción del plasma en polvo y del líquido fue de 3/8 (p/v).

### III.B.2. PREPARACIÓN DE LOS SISTEMAS CÁRNICOS

Los sistemas de ligazón se incorporaron a emulsiones cárnicas o a las superficies de carne previamente tratadas para la obtención de piezas reestructuradas.

#### III.B.2.1. ELABORACIÓN DE LAS EMULSIONES CÁRNICAS

Las emulsiones cárnicas fueron preparadas a partir de piezas cárnicas desprovistas de grasa y tejido conectivo, procedentes de los músculos del pernil. La transformación de la carne en pasta fina se realizó en una cortadora *cutter*. Todas las emulsiones llevaban incorporado un 10 % de agua (v/p) respecto al peso total de masa. Cuando fue necesario añadir NaCl se realizó disolviendo esta sal en la cantidad de agua incorporada.

#### III.B.2.2. ELABORACIÓN DE EMULSIONES CÁRNICAS ADICIONADAS CON AGENTES DE LIGAZÓN EN FRÍO

Para la elaboración de emulsiones cárnicas se han utilizado los dos agentes de ligazón derivados del plasma sanguíneo, el sistema fibrinógeno-trombina (FT) y las proteínas del plasma sanguíneo deshidratadas.

- a) Emulsiones cárnicas adicionadas con la mezcla FT. Fueron preparadas de diferente forma en función del análisis que se fuera a realizar. Se prepararon cuatro emulsiones cárnicas para el análisis de imagen de resonancia magnética, en las que los ingredientes se fueron adicionando según las siguientes cantidades y orden: a) 100 g de emulsión cárnica, 10 mL de F y 1 mL de T; b)

100 g de carne, 11 mL de agua, 10 mL de F y 1 mL de T; c) 100 g de carne, 11 mL de una disolución al 12 % de NaCl, 10 mL de F y 1 mL de T; y d) 100 g de carne, 11 mL de una disolución al 24 % de NaCl, 10 mL de F y 1 mL de T, de tal forma que las dos últimas presentan un 1 % y 2 % de NaCl, respectivamente en la mezcla final. Estas emulsiones se mantuvieron en moldes de plástico redondos y envasados a alto vacío, a 4 °C durante 24 horas hasta su análisis. Por otro lado, los homogeneizados que se prepararon para su incorporación en los productos reestructurados consistieron en mezclas de emulsiones cárnicas con diferentes proporciones del sistema fibrinógeno-trombina (0, 10, 20, 30, 40 y 50 % de FT en la mezcla final [p/v]). Durante la preparación de la emulsión cárnica se incorporó en la solución acuosa, la cantidad necesaria de NaCl que debía aparecer en la mezcla final, que correspondió a valores de 0, 0,25, 0,5 y 2 % de NaCl. Los ingredientes se incorporaron a la mezcla siguiendo un orden determinado, primero la emulsión cárnica (constituida por la carne y el agua o la solución salina), después el fibrinógeno y por último la trombina. Las muestras se mantuvieron en moldes circulares a 6 °C durante 12 horas hasta que se efectuó el análisis.

- b) Emulsiones cárnicas adicionadas con proteínas de plasma deshidratadas. Se elaboraron de dos tipos. Una primera que consistió en adicionar el preparado de proteínas a una emulsión cárnica sin sal y la otra que se obtuvo de la adición de proteínas de plasma a una emulsión cárnica que contiene NaCl, de tal forma que la mezcla final presente una concentración de NaCl del 2 %. Ambas mezclas fueron preparadas manteniendo las proporciones emulsión cárnica/fase líquida (agua o solución salina)/PP de 90/10/27, lo que supone una adición del 6 % del preparado de proteínas de plasma en la mezcla final. Las mezclas se prepararon en una mezcladora-*cutter* vertical que funciona a vacío, manteniendo una temperatura inferior a 2 °C y añadiendo los ingredientes siempre en el mismo orden, primero la emulsión cárnica, después el agua o la solución salina y por último el preparado de proteínas del plasma. Los sistemas se mantuvieron en moldes de plástico redondos (con un espesor de 0,5 cm para los análisis físico-químicos y la textura, y 1,5 cm para las medidas de imagen de resonancia magnética) y envasados a alto vacío, a 4 °C durante 72 horas hasta su estudio.

### III.B.2.3. ELABORACIÓN DE MODELOS CÁRNICOS

Se prepararon distintos modelos cárnicos constituidos por dos piezas de carne, superpuestas por una de sus caras, previamente tratadas, con un agente de ligazón. El procedimiento seguido incluyó las siguientes operaciones: 1) preparación de porciones cárnicas, 2) pre-tratamiento de las superficies a tratar con el agente de ligazón, 3) disposición del agente de ligazón sobre las superficies pre-tratadas, 4) superposición de las superficies tratadas con el agente de ligazón procedentes de dos porciones cárnicas y 5) período de ligazón o reposo de las piezas unidas (con o sin envasar). Las piezas resultantes (modelos cárnicos) se mantuvieron a distintas temperaturas y se determinó la fuerza de ligazón a diferentes tiempos.

1) Preparación de porciones cárnicas. Los modelos cárnicos fueron preparados empleando piezas de carne procedentes de los músculos que integran el pernil de cerdo, utilizando cubos de aproximadamente 10 cm de arista, desprovistos de grasa y tejido conectivo. Las piezas cárnicas se mantuvieron en refrigeración hasta el momento de su uso. El tiempo de refrigeración nunca fue superior a 24 horas.

2) Pre-tratamiento de las superficies cárnicas. Con el objetivo de estudiar cómo influía el estado de solubilización de las proteínas miofibrilares en los fenómenos de ligazón intersuperficiales, las superficies que se iban a poner en contacto con el agente de ligazón se sometieron a los tratamientos superficiales indicados a continuación:

- Sin tratamiento superficial.
- Con un salazonado en seco, que consistió en aplicar una mezcla de sales ( $\text{NaCl}$  con 200 ppm de  $\text{KNO}_3$  y 100 ppm de  $\text{NaNO}_2$ ) y malaxar la superficie con ellas durante 15 minutos para posteriormente retirarla con una salmuera (al 3 %  $\text{NaCl}$  que contiene 200 ppm de  $\text{KNO}_3$  y 100 ppm de  $\text{NaNO}_2$ ).
- Con un salazonado húmedo, en el que las piezas cárnicas fueron sumergidas durante 15 minutos en una salmuera (al 3 %  $\text{NaCl}$ , que también contiene 200 ppm de  $\text{KNO}_3$  y 100 ppm de  $\text{NaNO}_2$ ), a 4 °C.

3) El agente de ligazón, en cualquiera de sus formas de preparación, fue distribuido de forma uniforme sobre dos superficies cárnicas que fueron sometidas al mismo tratamiento superficial.

4) Las piezas cárnicas con el agente de ligazón en su superficie se pusieron en contacto, dando lugar a la zona o línea de ligazón, constituida por la interfase superficie cárnica-agente de ligazón-superficie cárnica.

5) Período de ligazón o reposo, corresponde al tiempo que se mantuvieron las piezas cárnicas en contacto con el agente de ligazón (desde 0 hasta el momento en el que la fuerza de ligazón se mantuvo constante). A lo largo de este período se realizaron ensayos para determinar la fuerza de ligazón. Las variables que se han estudiado durante el período de ligazón fueron:

- La forma de conservación de las muestras. Las muestras se mantuvieron en el interior de bolsas de plástico sin aplicación de presión o cerradas a alto vacío (20 kPa), para así asegurar el contacto entre las superficies cárnicas y favorecer el establecimiento de interacciones entre los sistemas de ligazón en frío y los miosistemas.
- La temperatura de ligazón. Para ello se mantuvieron las muestras a tres temperaturas diferentes, 0, 7 y 24 °C.

### III.B.2.4. REESTRUCTURACIÓN DE PERNILES DESHUESADOS

Los pernils se adquirían en un establecimiento comercial, ya deshuesados. Para la reestructuración de los pernils se procedió de forma similar a como se ha indicado en el punto anterior para los modelos cárnicos. Las superficies cárnicas internas que se encontraban en contacto con el hueso fueron sometidas a los mismos pre-tratamientos indicados para los modelos cárnicos. A continuación se distribuyó sobre las mismas el agente de ligazón y las piezas se conformaron para asegurarse que las superficies pre-tratadas entraban en contacto con los agentes de ligazón y que no existían oquedades. Los pernils así tratados, se almacenaron de tres formas:

- Sin envasar durante el tiempo correspondiente al período de ligazón.
- Envasado a alto vacío (20 kPa) durante el tiempo necesario para que se produzca la estabilidad de la ligazón entre las piezas cárnicas.
- Envasado a alto vacío con una mezcla de sales que contiene NaCl con 200 ppm de  $\text{KNO}_3$  y 100 ppm de  $\text{NaNO}_2$ . En este caso, las porciones cárnicas se envasaron a vacío rodeadas de sal, justo después de poner en contacto las superficies, a unir, sobre las que se aplicó el agente de ligazón y se mantuvieron a 6 °C. El tiempo que las muestras permanecieron de esta forma se corresponde con el que se necesita para su salazonado, a razón de un tiempo comprendido entre

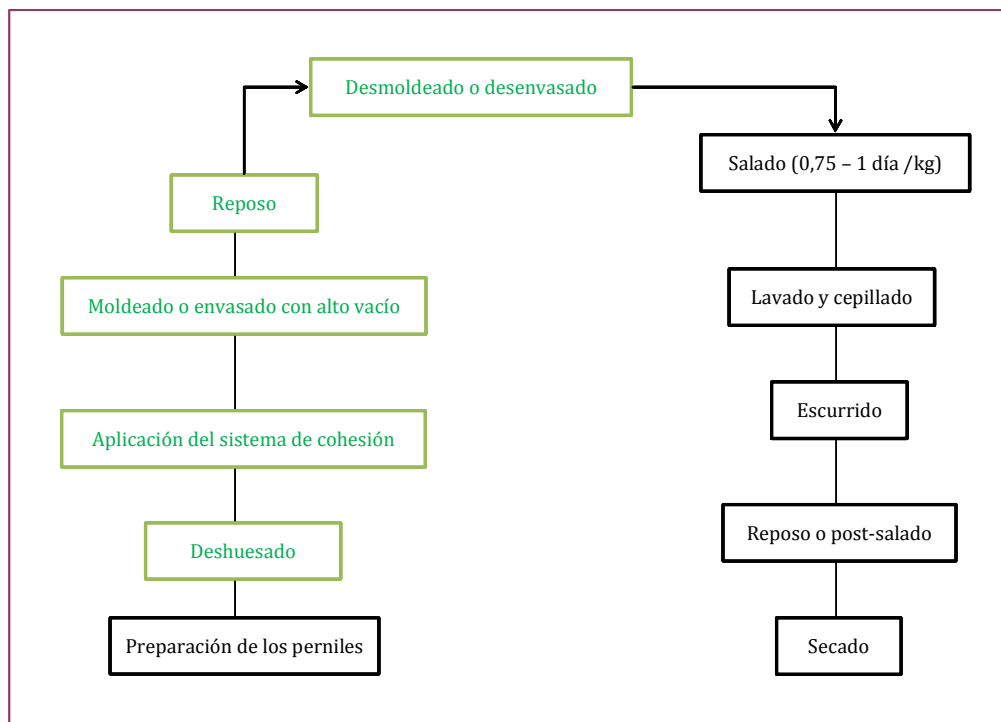
0,7 y 1 día/ kg de carne, de esta forma, el período de ligazón queda incluido en el de salazonado (ligazón y salado simultáneos).

### III.B.2.5. SALADO Y SECADO DE PERNILES REESTRUCTURADOS

Los perniles reestructurados que no fueron envasados a alto vacío con la mezcla de sales, se salaron con dicha mezcla tras alcanzar la máxima fuerza de ligazón. El salazonado se realizó en función de un período comprendido entre 0,7 y 1 día/ kg de carne, conservando las muestras a 6 °C.

Después de finalizar el período de salazonado, se retiró el exceso de sal y las piezas fueron sometidas a un proceso de secado durante varias semanas, manteniendo las muestras a 10 °C, con una humedad relativa del 80 %.

En conjunto los perniles reestructurados se trataron siguiendo un procedimiento muy similar al tradicionalmente empelado para la elaboración de jamón curado. El diagrama del proceso utilizado se muestra en la Figura III.2 donde se destacan en color verde las operaciones que se han introducido.



**Figura III.2.** Etapas de elaboración de perniles reestructurados realizadas en esta memoria.



### III.B.3. DETERMINACIONES GENERALES

#### III.B.3.1. DETERMINACIÓN DE pH

El pH-metro utilizado fue de la marca Crison Digital 501 mod. 2001 (Crison Instruments Ltd., Barcelona, España). El pH se determinó por inmersión del electrodo en una solución homogeneizada de la muestra en agua destilada con una relación 1/9 (p/v). La calibración del pH-metro se realizó con las soluciones tampones de referencia de pH 4 y 7 (suministradas también por Crison) y el electrodo se mantuvo sumergido en una solución de KCl 3M y AgCl para su correcta conservación.

Se realizaron tres o cuatro réplicas de cada muestra.

#### III.B.3.2. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE AGUA

Para determinar la actividad de agua se utilizó un higrómetro de punto de rocío Decagon CX-1 a una temperatura de 25 °C junto con las cápsulas suministradas por el fabricante. Para comprobar que las medidas realizadas se encontraban dentro de un rango adecuado, cada vez que se conectó el equipo se comprobó su correcto funcionamiento utilizando dos líquidos de actividad de agua ( $a_w$ ) conocida para comprobar que se alcanzaban los valores de referencia. Uno de los líquidos fue agua destilada ( $a_w = 1,000$ ), y el otro una solución saturada de cloruro sódico ( $a_w = 0,775$ ). El higrómetro proporcionó directamente los valores de actividad de agua (con una precisión de  $\pm 0,003$  unidades) y la temperatura a la que se realizó la medida.

Se realizaron cuatro réplicas de cada muestra.

#### III.B.3.3. DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA

La determinación de la capacidad de retención de agua (CRA) fue realizada utilizando el método de presión de Kauffman (1986b). Dicho método consiste en colocar 0,3 g de muestra en trozos pequeños sobre un papel de filtro (Whatman No.1, 125 mm) y someterlo a una presión (345 kPa) entre dos placas de metacrilato (125 x 70 mm) durante 5 minutos. La capacidad de retención de agua se expresó como el porcentaje de agua retenida en la muestra y se calculó a partir del agua que se liberó de la misma.

Se realizaron tres réplicas de cada muestra.

#### III.B.3.4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO ACUOSO

La determinación del contenido de agua de las muestras fue realizada según el procedimiento AOAC (1995), mediante secado de la muestra, manteniéndola en una estufa (Heraeus mod. T6200) a una temperatura de 110 °C hasta alcanzar peso constante.

Para ello, las cápsulas de porcelana utilizadas, se deshidrataron en una estufa a 110 °C durante 3 horas y se dejaron enfriar en un desecador a vacío, de vidrio cargado con gel de sílice activado. Se pesaron 4 g de muestra en una balanza de precisión y se introdujeron en las cápsulas de porcelana. A continuación, se deshidrataron en la estufa a 110 °C, hasta peso constante, aproximadamente 48-72 h. Las muestras deshidratadas se dejaron enfriar en un desecador y se volvieron a pesar en la balanza de precisión. El contenido de agua de la muestra se determinó por diferencia entre el peso de la muestra fresca y el de la muestra desecada, una vez alcanzado el peso constante. El extracto seco se calculó restando el contenido de agua del peso del producto cárnico.

Se realizaron cuatro réplicas de cada muestra.

#### III.B.3.5. DETERMINACIÓN DE CENIZAS

El análisis de las cenizas, o contenido mineral total, de las muestras fue realizado siguiendo el procedimiento AOAC (1995), según el cual se pesaron 4g de muestra, en una cápsula de porcelana previamente desecada y tarada, y se mantuvieron en una mufla a 550 °C hasta la incineración completa de la muestra. Una vez que la temperatura disminuyó, la muestra se introdujo en un desecador a vacío hasta su enfriamiento completo, para evitar la captación de humedad. Posteriormente, se pesó en una balanza analítica de precisión para calcular la cantidad total de cenizas por diferencia de pesada con la cápsula vacía, previamente tarada.

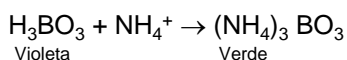
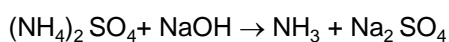
Se realizaron cuatro réplicas de cada muestra.

#### III.B.3.6. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

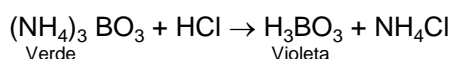
La cuantificación de la proteína se realizó mediante la determinación de nitrógeno total por el método de Kjeldahl (AOAC, 1997). Para medir el contenido proteico de las muestras, primero se pesaron 1,5 g de las mismas, se trocearon y se introdujeron en un tubo Kjeldahl junto a una pastilla de 5 g de catalizador (99,9 % de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 0,1 % de Se), 3-4 perlas de vidrio y 20 mL de ácido sulfúrico al 96%. Se preparó también un blanco,

consistente en un tubo Kjeldahl que contiene lo mismo que el anterior pero sin los 1,5 g de la muestra. Se cargó el digestor con los tubos Kjeldahl, se cerró el circuito y se calentaron a 350-400 °C durante 5 horas, hasta que el contenido de los tubos quedó de color amarillo claro y transparente. Se dejaron enfriar los tubos a temperatura ambiente y se procedió a la destilación de la muestra digerida. La destilación se realizó en un equipo automático, manteniendo los contenedores de reactivos con cantidad suficiente para realizar el proceso. Se colocaron en el destilador el tubo que contiene la muestra digerida, y un Erlenmeyer con un par de gotas de indicador Kjeldahl (0,2 % de rojo de metilo y 0,1 % de azul de metileno en etanol al 96 % (v/v), protegido de la luz) para recoger el destilado.

La destilación se inicia añadiendo NaOH al 40%, y después H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub> al 4 %. Las reacciones que ocurren son las siguientes:



Se obtiene un destilado de color verde, que contiene borato amónico y que es necesario valorar con HCl 0,5 N para poder calcular la cantidad de ácido bórico que hay presente en la muestra. El punto final de la valoración se alcanza cuando la muestra se torna a color violeta porque todo el borato amónico ha reaccionado.



Los equivalentes de ácido consumidos corresponden a los equivalentes de amoníaco destilados.

Para calcular el % de nitrógeno total se empleó la fórmula:

$$\% \text{ Nitrógeno total} = V_{\text{HCl}} \times N_{\text{HCl}} \times P_{\text{m nitrógeno}} / \text{mg muestra} \times 100$$

donde:  $V_{\text{HCl}}$  = mL de HCl gastados para neutralizar la muestra – mL de HCl empleados para neutralizar el blanco

$$P_{\text{m nitrógeno}} = 14,007 \text{ g mol}^{-1}$$

El cálculo de la cantidad de proteína a partir del nitrógeno total se obtiene aplicando el factor de conversión 6,25, utilizado para carne y derivados, asumiendo que las proteínas cárnicas tienen un 16 % de nitrógeno:

$$\% \text{ proteína} = \% \text{ N total} \times 6,25$$

### III.B.3.7. DETERMINACIÓN DE GRASA

La determinación del contenido de grasa de las muestras se realizó utilizando el método de Bligh y Dyer (1959), mediante una extracción en frío con cloroformo y metanol en presencia del antioxidante BHT para posteriormente cuantificar de forma gravimétrica, según el método descrito por Hanson y Olley (1963).

El método consistió en pesar 20 g de muestra, que se homogeneizó con una mezcla de metanol/cloroformo 40/20 (v/v), a la que se añadió una punta de espátula de BHT (2,6-di-terc-butil-4-metilfenol al 98 %) para evitar la oxidación durante el proceso. A continuación, se añadieron 20 mL de cloroformo y 20 mL de suero fisiológico y se homogeneizó, acoplado a un baño de hielo, durante 3 minutos. La mezcla se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos y se separó en tres fases: la superior fundamentalmente acuosa, la intermedia que contiene las proteínas y la inferior que es la fase orgánica y contiene la grasa. Se tomaron 20 mL de la fase orgánica con ayuda de una pipeta Pasteur para filtrarlo a través de un algodón impregnado con cloroformo/metanol (2:1) que también contiene una punta de espátula de sulfato sódico anhidro, para retener pequeños restos de agua que se pudieran haber arrastrado durante el proceso. Por último, se evaporó el cloroformo en un rotavapor.

El porcentaje de grasa de las muestras se estimó por diferencia de pesada:

$$\% \text{ grasa} = 100 \times 2 \times (P_g - P_v) / M$$

donde: M = peso de la muestra (g)

$P_g$  = peso del matraz después de evaporar el disolvente (g)

$P_v$  = peso del matraz vacío (g)

### III.B.3.8. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NaCl

La determinación de cloruros en las muestras cárnicas se realizó mediante el método oficial OAO 935.47, basado en una volumetría, en la que se utilizó tiocianato de amonio ( $\text{NH}_4\text{SCN}$ ) 0,1 N como reactivo para valorar un analito que contiene un indicador férrico.

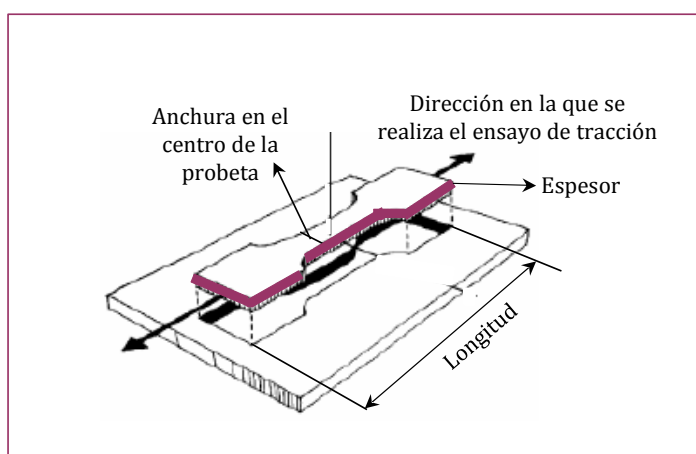
El método consistió en pesar entre 2,5- 3,0 g de muestra en un Erlenmeyer de 250 mL y añadir un exceso de  $\text{AgNO}_3$  0,1 N (25 mL). Después se agregaron 10 mL de  $\text{HNO}_3$  y se llevó a ebullición hasta que la muestra cárnica se disolvió. Posteriormente se adicionó una solución de  $\text{KMnO}_4$  al 5 % en pequeñas alícuotas de 1 mL, llevándose de nuevo a ebullición después de cada adición, hasta que el color del  $\text{KMnO}_4$  desapareció. Se adicionaron 25 mL de agua y se llevó a ebullición durante 5 minutos. Se esperó a que estuviera frío y se valoró con  $\text{NH}_4\text{SCN}$  0,1 N hasta que en la disolución persistió un color café claro.

La cuantificación del contenido de cloruros se determinó mediante la expresión:

$$\% \text{ NaCl} = \frac{[(\text{mL AgNO}_3 \times \text{N AgNO}_3) - (\text{mL NH}_4\text{SCN} \times \text{N NH}_4\text{SCN})] \times 5,844}{\text{Peso de muestra (g)}}$$

### III.B.4. REALIZACIÓN DEL ENSAYO DE TRACCIÓN UNIAXIAL DESTRUCTIVO

Para adaptar el ensayo de tracción al análisis de los distintos tipos de productos estudiados se prepararon probetas con varias formas y dimensiones. En cuanto a las formas se probaron cortes rectangulares y en forma de pesa (Figura III.3). La longitud y anchura de las probetas se ajustaron en función de las pinzas utilizadas. En el caso de las pinzas A/TGT se analizaron probetas entre 5 y 7,5 cm de longitud, y entre 1 y 2,5 cm de anchura. Cuando se utilizaron las pinzas A/MTG se ensayaron probetas con una longitud de 4 a 7 cm, y con una anchura entre 0,5 y 2 cm. En todos los casos, se analizaron probetas con un espesor que osciló entre 0,2 y 0,5 cm.

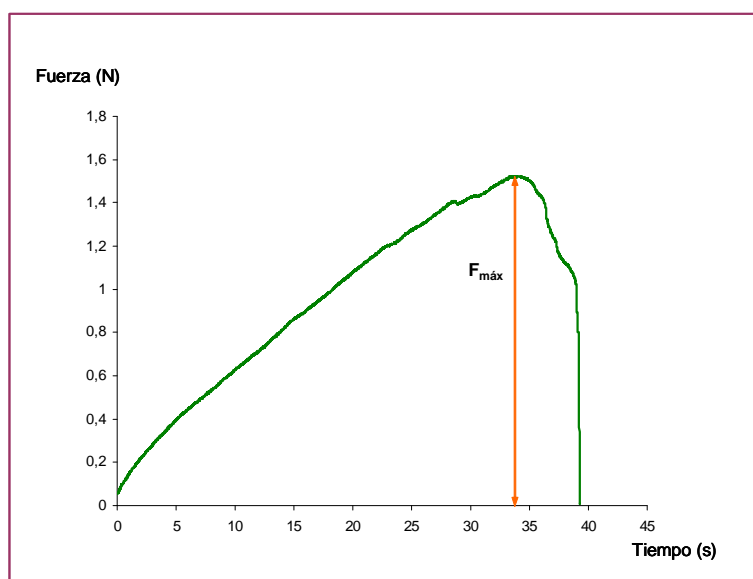


**Figura III.3.** Probeta en forma de pesa utilizada en el ensayo de tracción uniaxial. Adaptación del modelo de Honikel, (1998).

Para la realización de este ensayo, las pinzas (A/TGT y A/MTG) constituidas por dos elementos, se dispusieron de forma que uno de ellos se fijó a la base del texturómetro y el otro se ancló al brazo móvil del equipo, conectado con la célula de carga. Las probetas de ensayo se colocaron entre los dos extremos de las pinzas, de forma que quedasen lo más estiradas posible, y se inició la tracción a una velocidad de  $1 \text{ mm s}^{-1}$  hasta su rotura.

Se realizaron entre 3 y 10 ensayos, dependiendo del tipo de muestras.

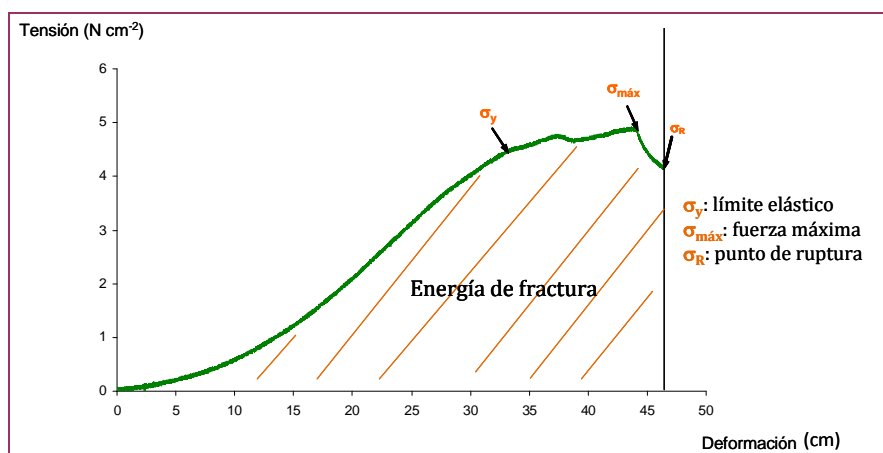
Una vez concluido el ensayo, se obtuvieron las curvas fuerza-tiempo (un ejemplo de estas curvas se muestra en la Figura III.4) o fuerza-distancia utilizando el *software* del texturómetro (Texture Exponent 32). El procesado de los datos en el programa Origin 8.0 permitió obtener las curvas esfuerzo-deformación (véase Figura III.5) utilizadas en el análisis del comportamiento mecánico de las muestras.



**Figura III.4.** Representación gráfica fuerza-tiempo de un ensayo de tracción.

La fuerza máxima (N) obtenida en las curvas de fuerza-tiempo (Figura III.4) fue considerada como la fuerza de ruptura. La resistencia a la ruptura ( $\text{N cm}^{-2}$ ) fue calculada como el cociente entre la fuerza máxima y el área de sección (anchura x espesor). Para calcular este parámetro sólo se consideraron válidos los ensayos en los que la ruptura se produjo en la parte central de las probetas. La energía de fractura (N

mm) fue calculada como el área bajo la curva de deformación (Figura III.5) (Honikel, 1998).



**Figura III.5.** Representación gráfica tensión-deformación de un ensayo de tracción.

Para la determinación de la fuerza de ligazón se utilizó un ensayo de tracción uniaxial destructivo en el que se analizaron muestras procedentes de sistemas reestructurados. En este caso, las probetas presentaron en el centro de las piezas la zona de interacción carne-sistema de ligazón-carne. La fuerza de ligazón se calculó como la fuerza máxima de las curvas fuerza-tiempo dividido por el área de sección ( $\text{N cm}^{-2}$ ).

### III.B.5. REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS DEL PERFIL DE TEXTURA

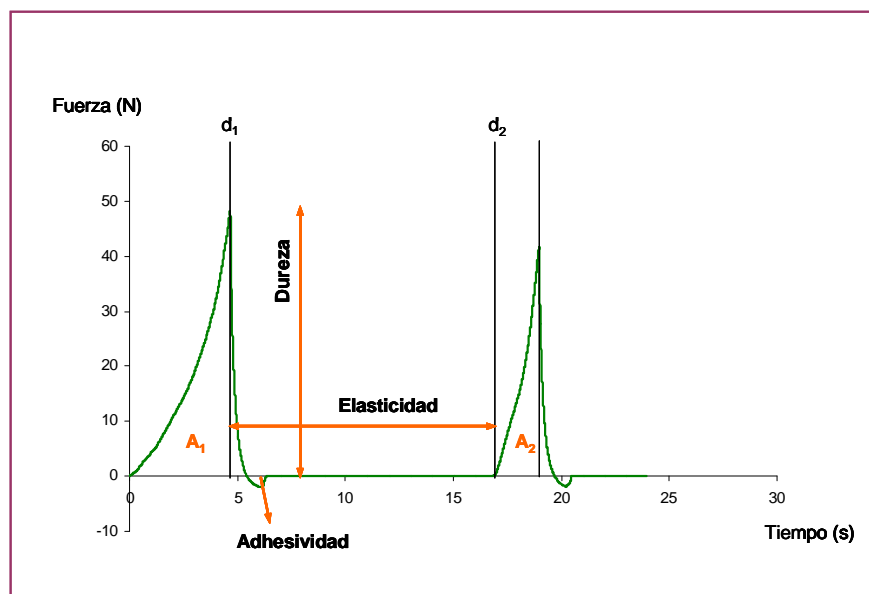
Para la realización del análisis del perfil de textura se utilizaron muestras con forma cilíndrica, con una altura de 15 mm y un diámetro de 20 mm, obtenidas mediante un sacabocados.

El ensayo se efectuó a una velocidad de  $2 \text{ mm s}^{-1}$ . Para la adecuación del ensayo se realizaron análisis comprimiendo las muestras un 35, 50 y 75 % de su altura. El ensayo consistió en la realización de dos compresiones consecutivas sobre la muestra, donde el tiempo de recuperación, transcurrido entre ambas compresiones, fue de 5 segundos, ascendiendo a su posición inicial a una velocidad de  $10 \text{ mm s}^{-1}$ . Una vez concluido el ensayo, se obtuvo una gráfica (Figura III.6) que representó la fuerza aplicada

(ordenadas) frente al tiempo de ensayo (abcisas), en la que se definen los siguientes parámetros:

- *Dureza*: definida como la altura máxima obtenida en el primer ciclo de compresión. Representa la fuerza máxima para producir una cierta deformación. Se expresa en unidades de fuerza, generalmente en newtons (N).
- *Adhesividad*: corresponde al área de fuerza bajo el eje de abcisas que resulta tras la primera compresión. Se define como el trabajo necesario para retirar la sonda de la muestra después de realizar la primera compresión. Presenta siempre un valor negativo. Se expresa en unidades de fuerza x tiempo, generalmente en N s.
- *Elasticidad*: se define como la capacidad de la muestra para recuperar su forma original, una vez que cesa (deja de aplicarse) la fuerza deformante. Corresponde a la diferencia entre las alturas registradas en la muestra tras la primera compresión ( $d_1$ ) y al iniciar la segunda ( $d_2$ ). Se expresa en unidades de longitud, generalmente en mm o m.
- *Cohesividad*: se define como el grado en que una muestra puede deformarse sin llegar a romperse. Corresponde a la relación que existe entre las áreas positivas de la segunda y la primera compresión ( $A_2/A_1$ ). Es adimensional.
- *Masticabilidad*: se define como el producto de la gomosidad y la elasticidad, es decir, por el producto de dureza por cohesividad por elasticidad. Representa el trabajo necesario para desintegrar una muestra hasta dejarla lista para la deglución. Se expresa en unidades de fuerza x longitud, generalmente en N m.





**Figura III.6.** Representación gráfica de un ensayo de doble compresión (TPA).

### III.B.6. MICROESTRUCTURA DE LAS MUESTRAS MEDIANTE IMAGEN DE RESONANCIA MAGNÉTICA

La determinación de la microestructura de las muestras mediante IRM requiere una preparación de las mismas y así poder colocarla en la bobina de frecuencia para la transmisión y recepción del espectrómetro. Las muestras fueron cortadas en pequeñas piezas (4 cm largo x 3 cm ancho x 1,5 cm de espesor) y se colocaron sobre una sonda construida en nuestro laboratorio (superficie de 4 cm x 4 cm).

Una vez realizada la homogeneización del campo se adquirieron tres imágenes eco de espín (axial, coronal y sagital) para poder colocar los cortes de adquisición en la zona deseada.

Para las medidas del tiempo de relajación espín-espín o transversal ( $T_2$ ) las imágenes fueron adquiridas cada 20 ms con tiempos de eco ( $TE = 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180$  y  $200$  ms) hasta obtener un total de 10 ecos. El resto de parámetros de adquisición que permanecieron constantes fueron: número de repeticiones: 1; tiempo de repetición: 3046,1 ms; matriz de adquisición (MTX):  $256 \times 256$ ; campo de visión (FOV):  $4 \times 4$  cm; número de cortes: 10; anchura del corte: 1 mm. Los datos así obtenidos se ajustaron a una exponencial de acuerdo con la ecuación:

$$S(TE) = S_0 \exp(-TE/T_2)$$

donde:  $S(TE)$  es la señal de la imagen a cada tiempo de eco ( $TE$ ) y  $S_0$  es la señal cuando el  $TE$  es igual a cero.

Para las medidas del tiempo de relajación espín-red o longitudinal ( $T_1$ ) se adquirieron experimentos utilizando un  $TE$  de 20 ms y diferentes valores en el tiempo de repetición ( $TR = 310, 510, 1210, 2010, 3010$  y  $6010$  ms) hasta obtener un total de 6 ecos. El resto de parámetros de adquisición que permanecieron constantes entre los diferentes experimentos fueron: matriz de adquisición (MTX):  $256 \times 128$ ; matriz de reconstrucción:  $256 \times 256$ ; campo de visión (FOV):  $4 \times 4$  cm; número de cortes: 8; anchura del corte: 1 mm. Los datos así obtenidos se ajustaron a una exponencial de acuerdo con la ecuación:

$$S(TR) = S_0 [1 - \exp(-TR/T_1)]$$

donde:  $S(TR)$  es la señal de la imagen a cada tiempo de recuperación ( $TR$ ) y  $S_0$  es la señal cuando el  $TR$  es igual a cero.

Para las medidas del Coeficiente de Difusión Aparente (ADC) las imágenes se adquirieron con cuatro valores de potenciación en difusión (valor  $b = 62,8, 370,8, 1131,4$  y  $2309,5$  s  $\text{mm}^{-2}$ ). El resto de parámetros de adquisición que permanecieron constantes entre los diferentes experimentos fueron: número de repeticiones: 1;  $TR = 2000$  ms;  $TE = 75$  ms; tiempo entre gradientes de difusión ( $\Delta$ ) = 50 ms; duración gradiente de difusión ( $\delta$ ) = 10 ms; matriz de adquisición (MTX):  $256 \times 128$ ; matriz de reconstrucción:  $256 \times 256$ ; campo de visión (FOV):  $4 \times 4$  cm; número de cortes: 5; anchura del corte: 1 mm (en los experimentos de difusión se dejó una separación entre cortes de 0,5 mm). Los datos así obtenidos se ajustaron a una exponencial de acuerdo con la ecuación:

$$ADC = \log(S/S_0)/b$$

donde:  $S$  es la señal potenciada en difusión y  $S_0$  es la señal de la imagen cuando el valor de la potenciación en difusión ( $b$ ) es igual a cero.

### III.B.7. MICROESTRUCTURA DE LAS MUESTRAS MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

La determinación de la microestructura de las muestras mediante microscopía electrónica de barrido requirió una preparación previa de las mismas, la cual implicó el corte de las muestras con las dimensiones apropiadas ( $< 0,5 \text{ cm}^2$ ), la deshidratación, la evaporación y la metalización de las mismas.

El corte de las muestras se realizó, con un bisturí de aluminio con mango mod. 4 y hoja No.18, en forma de cubos con un tamaño de arista inferior a 5 mm o en forma de láminas con un grosor máximo de 5 mm presentando la zona de sutura lo más en el centro posible de la muestra, cuando ésta lo requería. Posteriormente, fueron sumergidas en una solución de glutaraldehído al 4 % en suero fisiológico (concentración salina al 0,9 %) durante 4 horas para su fijación. Durante este período las muestras se mantuvieron en refrigeración a 4 °C.

Para la deshidratación de las muestras, una vez fijadas, el agente empleado fue el etanol. Se prepararon diferentes soluciones crecientes de etanol desde el 30 % hasta el 100 % (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 y 100). Las muestras se introdujeron dos veces en la misma concentración, haciendo un trasvase a otro recipiente con solución nueva cada 30 minutos. De esta forma, la muestra permaneció una hora en cada concentración de etanol.

A continuación se realizó el secado de las muestras mediante punto crítico (CPD, *critical point drying*) que consiste en desplazar el etanol de las muestras con  $\text{CO}_2$  líquido en condiciones estándar (temperatura = 31 °C, presión =  $7,38 \times 10^6 \text{ Pa}$ ), para posteriormente cambiar el  $\text{CO}_2$  líquido a  $\text{CO}_2$  en estado gaseoso y finalizar el proceso de secado liberando presión hasta alcanzar la presión atmosférica. El secado de punto crítico es un método para secar tejidos sin que estos colapsen o deformen su estructura original, minimizando las tensiones superficiales del tejido. Se utiliza con frecuencia en microscopía electrónica de barrido cuando se pretende visualizar muestras biológicas.

El siguiente paso fue la evaporación (a vacío), que consiste en recubrir las muestras con grafito (material transparente a los rayos X).

Por último, se procedió a la metalización de las muestras recubriéndolas con oro, para su posterior visualización en el microscopio electrónico de barrido. Las muestras utilizadas no son buenas conductoras, por lo que es necesario hacer conductora la

superficie, eliminar la electricidad estática, minimizar el daño por radiación y aumentar la reflectividad electrónica.

Las muestras se visualizaron en el microscopio electrónico de barrido a diferentes aumentos (x100, x200, x500, x1.000, x2.000, x3.000, x5.000, x10.000, x15.000), con el fin de observar la microestructura de las superficies de unión de las piezas cárnicas ligadas y de los sistemas de ligazón utilizados.

El proceso completo, desde el secado de las muestras mediante el punto crítico hasta la visualización en el microscopio electrónico de barrido, fue realizado en el Centro Nacional de Microscopía Electrónica con ayuda de los técnicos que trabajan allí.

### III.B.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de las propiedades de los resultados se realizó con el programa estadístico Statgraphics Plus versión 5.5 para Windows y el programa SPSS 15.0, también para Windows.

La comprobación de que los datos presentaron una distribución normal se realizó aplicando el test de Shapiro-Wilks. Cuando los datos se ajustaron a una distribución normal se realizó un análisis ANOVA de una vía, para determinar las variaciones entre las medias obtenidas. Sin embargo, cuando los datos no se ajustaron a una distribución normal, se empleó el test de Kruskal-Wallis para comprobar la hipótesis nula en la que las medianas de las variables, dentro de cada uno de los niveles de datos fueron las mismas. Para la comparación múltiple de las medias y establecer diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) se utilizó el test de Rango Múltiple de Duncan.

Los resultados se expresaron como valores medios con su desviación estándar o con el intervalo de confianza.

El análisis de regresión simple y múltiple, el análisis de componentes principales y las correlaciones entre las variables se realizaron utilizando el test de Durbin-Watson, estableciendo un nivel de confianza del 95%.

La velocidad de ligazón ( $k$ ) fue calculada según la función de Richard (Causton y Venus, 1981; Richard, 1959) que expresa que la fuerza de ligazón ( $F$ ) se incrementa linealmente con el tiempo ( $t$ ) desde un valor inicial ( $F_{ini}$ ) hasta un valor máximo ( $F_{max}$ ):

$$dF/dt = k [1 - (\ln F_{ini} / \ln F_{max})]$$

La distribución de probabilidad acumulada de Weibull se ha utilizado para calcular la probabilidad de fractura ( $P_f$ ) de los músculos de jamón. Esta distribución responde a la ecuación:

$$P_f = 1 - \exp [-(\sigma/\sigma_0)^m]$$

$$\text{donde } \begin{cases} P_f = 0 \text{ cuando no hay fractura} \\ P_f = 1 \text{ cuando hay fractura} \end{cases}$$

$\sigma$  es el esfuerzo en tensión aplicado sobre los tejidos

$\sigma_0$  es el esfuerzo característico. Es una propiedad del material sin un significado físico concreto. Define que tan elevados o bajos son los valores de la distribución de esfuerzos. Se define como el esfuerzo uniforme para el cual la probabilidad de fractura es de 0,6321 (63 %). Se expresa en unidades de tensión x superficie<sup>-2</sup> (N cm<sup>-2</sup>).

$m$  es el módulo es Weibull. Define que tan dispersa es la distribución del esfuerzo.

#### *IV. RESULTADOS*



## ***CAPÍTULO 1.***

### **ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO REOLÓGICO DE DISTINTOS PRODUCTOS CÁRNICOS**





## **Planteamiento del trabajo y objetivos**

*Cuando comenzamos a plantearnos el uso de agentes de ligazón en frío para la reestructuración de piezas cárnicas, las primeras cuestiones que nos abordaron fueron, entre otras, ¿Qué cabía esperar? ¿Qué teníamos que conseguir en la reestructuración de una pieza cárnica? ¿Cómo de intensa tenía que ser la unión entre superficies cárnicas? Nos dimos cuenta entonces que si queríamos valorar la intensidad de una “unión” entre superficies cárnicas aportada por un agente de ligazón, así como el comportamiento mecánico de un producto reestructurado, la mejor medida era su comparación con productos cárnicos comerciales. Nos planteamos entonces estudiar las propiedades reológicas de estos productos. Esta parte de la investigación, aunque concebida en el contexto del desarrollo de la elaboración de productos reestructurados, pronto tomó protagonismo propio, ya que en muchos de los productos cárnicos se tiene una información limitada a los parámetros derivados del análisis del perfil de textura (TPA). Nosotros quisimos saber algo más y aplicamos, también, un ensayo de tensión en el que los productos se sometieron a fuerzas de tracción. El ensayo uniaxial de tracción hasta la destrucción o rotura de la muestra aporta parámetros de gran importancia como es la tensión y la energía de rotura. Este tipo de ensayo es poco aplicado a los alimentos debido a las dificultades de la preparación y manipulación de las muestras. Sin embargo, parámetros derivados, como la mencionada tensión de ruptura, pueden ser útiles para mejorar el manejo de los productos, por ejemplo para predecir la probabilidad de rotura cuando se lonchean y se envasan.*

*La adaptación de los ensayos de tracción al estudio de los productos cárnicos nos permitió fijar las condiciones de ejecución del mismo para determinar la “fuerza de ligazón o de unión” entre superficies cárnicas en los productos reestructurados, así como estimar su equivalencia con la fuerza de ruptura de productos cárnicos comerciales, por ejemplo, podemos decir que la fuerza de ligazón derivada de la actividad de un determinado agente de ligazón en frío es equivalente a la requerida para romper una loncha de jamón curado o de otro producto cárnico comercial. Es decir, podemos dimensionar el resultado de la reestructuración de las piezas de carne en términos de producto cárnico comercial.*

*Los objetivos parciales planteados en esta etapa fueron:*

- 1. Determinar el comportamiento reológico de productos cárnicos comerciales en ensayos de tracción y determinar su correlación con parámetros derivados del análisis del perfil de textura y con características físico-químicas.*
- 2. Analizar el comportamiento mecánico del jamón curado.*
- 3. Establecer las condiciones de trabajo en ensayos de tracción para determinar la fuerza de ligazón en los productos reestructurados.*



## ***CAPÍTULO 1. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO REOLÓGICO DE DISTINTOS PRODUCTOS CÁRNICOS***

Los resultados de este capítulo se recogen en los siguientes artículos:

- **ARTÍCULO 1.1.** Breaking strength of dry fermented sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) and physico-chemical characteristics
- **ARTÍCULO 1.2.** Tensile properties of cooked meat sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) parameters and physico-chemical characteristics
- **ARTÍCULO 1.3.** Tensile test and Texture Profile Analysis (TPA) to monitoring rheological properties of commercial cooked meat products
- **ARTÍCULO 1.4.** A study of the mechanical properties of dry cured ham



**ARTÍCULO 1.1.**

**Breaking strength of dry fermented sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) and physico-chemical characteristics**

**Meat Science. (2007). 77 (3), 331 – 338.**



# Breaking strength of dry fermented sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) and physico-chemical characteristics

A.M. Herrero <sup>a</sup>, J.A. Ordóñez <sup>b</sup>, Romero de Avila <sup>a</sup>, B. Herranz <sup>a</sup>,  
L. de la Hoz <sup>a</sup>, M.I. Cambero <sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Instituto de Ciencia y Tecnología de la Carne, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

Received 31 July 2006; received in revised form 19 February 2007; accepted 29 March 2007

## Abstract

In order to assess its usefulness for monitoring textural properties of dry fermented sausages (chorizo, salchichon, salami, fuet and mini-fuet) the determination of breaking strength (BS) was evaluated. Texture profile analysis (TPA) and physico-chemical measurements (pH, aw, dry matter, fat content) were also performed. The BS determined by tensile test and TPA analysis produced complementary information that allowed these meat products to be grouped according to four different textural profiles. These profiles were characterized ( $p < 0.05$ ) by the values of BS, hardness, adhesiveness, cohesiveness and springiness. Multivariate analysis confirmed that BS and TPA parameters were correlated significantly ( $p < 0.00005$ ). On basis of these results, TPA parameters could be used to construct regression models to predict BS and therefore, to obtain a more complete textural property description of the dry fermented sausages. The resulting regression model was  $BS = -0.777 + 0.728 \times \text{adhesiveness} - 16881 \times \text{cohesiveness} + 1884.61 \times \text{springiness} + 0.042 \times \text{hardness}$  ( $R^2 = 0.634$ ,  $p < 0.00005$ ).

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Tensile test; Texture profile analysis; Breaking strength; Dry fermented sausages

## 1. Introduction

Textural characteristics of food are important aspects of consumer acceptance. Many instrumental methods have been developed for food textural property determination (Bourne, 2002; Kilcast, 2004). Nowadays, the most commonly used instrumental method is probably, the compression method of texture profile analysis (TPA). This method mimics the conditions to which the material is subjected throughout the mastication process (Bourne, 1978; Scott-Blair, 1958).

The compression parameters obtained with TPA have been employed by many authors in their evaluations of meat products, such as dry fermented sausages, as an index

to determine the quality of the finished product or to select the best functional ingredients (Bruna, Fernández, Hierro, Ordóñez, & de la Hoz, 2000; Gimeno, Ansorena, Astiasarán, & Bello, 2000; Houben & van't Hooft, 2005; Hoz, D'Arrigo, Cambero, & Ordóñez, 2004; Mendoza, García, Casas, & Selgas, 2001; Muguerza, Gimeno, Ansorena, Bloukas, & Astiasarán, 2001; Visessanguan, Sootawat, Riebroy, & Thepkasikul, 2004).

A textural instrumental test has also been developed in which the measurements are based on resistance of the sample to force deformation (i.e., puncture, cutting, shear and tensile tests). These methods have the advantage of simplicity and the textural parameters obtained can be correlated with texture sensory analysis (Bourne, 2002). Of these, the tensile test may offer valuable and complementary information to that obtained using traditional instrumental texture methods (i.e., TPA). A conventional tensile test assumes that the sample fractures in a plane that

\* Corresponding author. Tel.: +34 913943745; fax: +34 913943743.

E-mail address: [icambero@vet.ucm.es](mailto:icambero@vet.ucm.es) (M.I. Cambero).



is approximately perpendicular to the plane of the applied tension. A load deformation curve to complete rupture is obtained, along which the rupture force corresponds to the maximum force (maximum peak height) resisted by the material. Other parameters from the load deformation curve can be measured, including breaking strength, total energy to fracture, modulus of elasticity and breaking strain (Bourne, 2002; Honikel, 1998).

The tensile test has been used to study the mechanical properties of muscle fibres. Several authors have employed tensile test to monitor the mechanical properties of myofibres during *rigor* onset and after *rigor* (Lepetit & Culioli, 1994; Willems & Purslow, 1996). Recently, Christensen, Young, Lawson, Larsen, and Purslow (2003) used tensile testing to study the changes of mechanical tension properties of single meat fibres during *post-mortem* storage. Some authors have used tensile tests on whole meat, single muscle fibres and perimysial connective tissue to determine the effect of cooking temperature (Lepetit & Culioli, 1994; Lewis & Purslow, 1989; Mutungi, Purslow, & Warkup, 1995, 1996; Willems & Purslow, 1996; Christensen, Purslow, & Larsen, 2000). However, there is little information about tensile measurements on other meat products such as dry fermented sausages.

The breaking strength offers information about the binding force between fat and meat particles in dry fermented sausages. These data could give valuable complementary information about dry fermented sausage behavior when they are sliced and vacuum packaged (with or without interleaving sheets). When these packages are opened and the sausage slices are taken out, many of them break because the product breaking strength is less than the superficial adhesion force between the product surfaces (mainly when no interleaving sheets are between slices). To avoid this problem it would be useful to know if sausages are suitable for slicing and vacuum packaging, i.e., slices with a breaking strength higher than the resistance offered by the adhered portions.

Therefore, the aim of this work was to apply tensile tests to dry fermented sausages to determine their breaking strength, relating these results to those of compression textural parameters (TPA) and physico-chemical characteristics, in order to provide a complete characterization of these products. Once the relationship between breaking strength and TPA parameters is established, multiple linear regression statistics could be used to predict the breaking strength using the TPA parameters as predictor variables. Thus, with a simple test (TPA) it should be possible to obtain data of tensile and compression textural parameters for dry fermented sausages.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Description of the samples

Samples of nine different commercial brands of chorizo (CH), seven of salchichon (SA), five of fuet (FU), five of

salami (SL) and four of mini-fuet (MF) were purchased in Spain in retail shops. According to information on the labels, the estimated ripening times were more than two months for chorizo, salchichon and salami, and less than one month for fuet and mini-fuet. For every commercial brand three different samples were purchased at different times of the year and then analysed before 48 h of storage at 15 °C. All the sausages were subjected to each type of physical, chemical and textural analysis.

### 2.2. Physical analysis

After three transverse cuts (2–4 cm from each border and in the central part) of the dry fermented sausages, Vernier calipers were used to measure the diameters of the samples (case not considered) and of the fat particles visible in all cut surfaces.

### 2.3. Chemical analysis

After removing the case, chemical analyses were made in duplicate on all dry fermented sausages. About 200 g of sample was finely cut and some aliquots were used for the different determinations. The pH was determined in a distilled water homogenate (1:10) (w/v) of the sample (10 g) with a Crison Digit-501 pH meter (Crison Instruments LTD, Barcelona, Spain). Dry matter (DM) was determined by drying the sample at 110 °C to constant weight and the results were expressed as a percentage. Water activity ( $a_w$ ) was measured using a Decagon CX1 hygrometer (Decagon Devices Inc., Pullman, WA, USA) at 25 °C. The total fat content of the samples was determined by cold extraction in chloroform and methanol in the presence of antioxidant BHT as described by Hanson and Olley (1963) and was quantified gravimetrically. Results were expressed as percentage of dry matter (DM).

### 2.4. Textural analysis

Texture profile analysis (TPA) and tensile testing were performed at about 22 °C using a TA.XT2i Stable Micro Systems Texture Analyser (Stable Microsystems Ltd., Surrey, England) with the *Texture Expert* programmes. Both textural procedures involved discarding the external case of the dry fermented sausages.

#### 2.4.1. Texture profile analysis (TPA)

In general, this procedure involved the preparation of four cylinders of 1.5 cm high and 2 cm wide from each dry fermented sausage. When samples of mini-fuet (diameter < 2 cm) were analyzed a width of 1 cm was employed. A double compression cycle test was performed up to 50% compression of the original portion height with an aluminium cylinder probe P/25. A time of 5 s was allowed to elapse between the two compression cycles. Force-time deformation curves were obtained with a 25 kg load cell applied at a cross-head speed of 2 mm/s. The following

parameters were quantified (Bourne, 1978): hardness ( $N$ ) maximum force required to compress the sample, springiness ( $m$ ), ability of the sample to recover its original form after deforming force was removed, adhesiveness ( $N \times s$ ), area under the abscissa after the first compression; cohesiveness, extent to which the sample could be deformed prior to rupture; and chewiness ( $J$ ), work required to masticate the sample before swallowing.

#### 2.4.2. Tensile test

In general, five pieces were cut approximately 7.5 cm long, 2 cm wide and 0.2 cm thick per sample. When samples of mini-fuet (diameter < 2 cm) were analyzed a width of 1 cm was employed. For analysis, one tensile grip (A/TGT) was fixed to the base of the textural analyser, while the other one was attached to the load cell. Initial grip separation was 17.0 mm and crosshead speed was 1.0 mm/s until rupture. Each sample was placed between both tensile grips on the textural analyzer (Fig. 1). Rupture force was taken as the maximum force peak height ( $N$ )

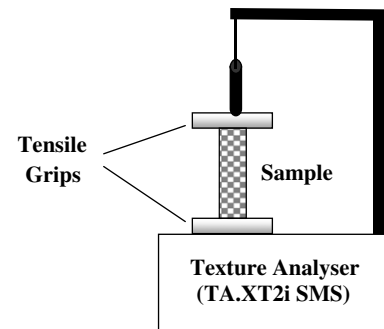


Fig. 1. Diagram of the tensile test performed on the samples (approximately  $7.5 \times 2 \times 0.2$  cm) with a TA.XT2i SMS Stable Micro Systems Texture Analyser.

required to break the sample. Breaking strength ( $N/cm^2$ ) was calculated by dividing the rupture force by the cross-sectional area (thickness  $\times$  width) of the portions (Honikel, 1998). Depending on the sample rupture force a load cell of 5 kg (<1 N) or 25 kg (>1 N) was employed.

Table 1

Assigned category according to fat particle (FP) size, sausage diameter, dry matter (DM), fat content (g/100 g of DM), water activity ( $a_w$ ) and pH of dry fermented sausages

Sample <sup>a</sup>	FP <sup>b</sup>	Diameter (cm)	DM (%)	Fat content (% DM)	$a_w$	pH
CH 1	4	$10.5 \pm 2.2a$	$67.5 \pm 9.5d$	$56.1 \pm 2.0b$	$0.859 \pm 0.001a,b$	$4.55 \pm 0.01c$
CH 2	3	$2.8 \pm 0.1d$	$68.4 \pm 4.8d$	$41.4 \pm 4.8c,d$	$0.815 \pm 0.003a,b$	$5.10 \pm 0.13b$
CH 3	4	$4.1 \pm 0.4c,d$	$77.3 \pm 0.2b$	$45.1 \pm 0.2c$	$0.809 \pm 0.010a,b$	$4.68 \pm 0.06b,c$
CH 4	4	$5.3 \pm 0.2c$	$67.9 \pm 0.9d$	$48.6 \pm 4.6b,c$	$0.796 \pm 0.004a,b$	$4.99 \pm 0.04b$
CH 5	4	$4.2 \pm 0.5c,d$	$69.3 \pm 4.9c,d$	$44.8 \pm 2.4c$	$0.845 \pm 0.004a,b$	$5.17 \pm 0.01b$
CH 6	4	$7.5 \pm 1.6b$	$61.2 \pm 2.6e$	$31.7 \pm 2.0e$	$0.828 \pm 0.004a,b$	$4.77 \pm 0.02b,c$
CH 7	4	$7.7 \pm 1.9b$	$62.7 \pm 6.7e$	$31.2 \pm 1.4e$	$0.824 \pm 0.002a,b$	$4.62 \pm 0.02b,c$
CH 8	1	$7.7 \pm 1.3b$	$66.8 \pm 1.5d$	$47.0 \pm 1.9b,c$	$0.846 \pm 0.006a,b$	$4.39 \pm 0.05c$
CH 9	3	$3.6 \pm 0.5c,d$	$76.1 \pm 0.6b$	$38.5 \pm 9.2c,d$	$0.821 \pm 0.004a,b$	$5.45 \pm 0.06a,b$
FU 1	2	$2.8 \pm 0.1d$	$68.6 \pm 0.8c,d$	$37.3 \pm 2.3d,e$	$0.875 \pm 0.001a$	$5.24 \pm 0.13b$
FU 2	2	$3.3 \pm 0.2c,d$	$69.7 \pm 2.8c,d$	$43.3 \pm 0.2c,d$	$0.778 \pm 0.004b$	$5.42 \pm 0.04a,b$
FU 3	3	$2.5 \pm 0.3d$	$70.9 \pm 0.3c$	$35.7 \pm 0.8d,e$	$0.836 \pm 0.012a,b$	$5.93 \pm 0.07a$
FU 4	2	$2.3 \pm 0.1d$	$78.9 \pm 0.3b$	$25.6 \pm 1.8e,f$	$0.769 \pm 0.009b$	$6.65 \pm 0.18a$
FU 5	2	$2.2 \pm 0.1d$	$79.1 \pm 0.3b$	$25.7 \pm 1.8e,f$	$0.770 \pm 0.008b$	$6.62 \pm 0.19a$
MF 1	2	$1.0 \pm 0.1e$	$80.4 \pm 0.1b$	$21.9 \pm 1.0f$	$0.650 \pm 0.001c$	$6.17 \pm 0.02a$
MF 2	2	$1.0 \pm 0.1e$	$84.7 \pm 0.1a$	$24.4 \pm 1.0e,f$	$0.649 \pm 0.001c$	$5.84 \pm 0.01a$
MF 3	2	$1.0 \pm 0.1e$	$82.7 \pm 0.1a$	$22.0 \pm 1.0f$	$0.651 \pm 0.001c$	$6.05 \pm 0.02a$
MF 4	2	$1.1 \pm 0.1e$	$83.0 \pm 0.1a$	$24.1 \pm 1.0e,f$	$0.648 \pm 0.001c$	$6.10 \pm 0.01a$
SL 1	1	$6.5 \pm 0.5b,c$	$80.0 \pm 0.1b$	$71.7 \pm 0.1a$	$0.894 \pm 0.014a$	$4.58 \pm 0.01c$
SL 2	1	$8.2 \pm 1.1b$	$64.6 \pm 0.1d,e$	$51.7 \pm 0.1b,c$	$0.876 \pm 0.004a,b$	$4.42 \pm 0.03c$
SL 3	1	$10.7 \pm 0.8a$	$67.8 \pm 2.6d$	$36.3 \pm 1.2d,e$	$0.839 \pm 0.020a,b$	$4.65 \pm 0.03b,c$
SL 4	1	$12.0 \pm 1.6a$	$71.8 \pm 0.6c$	$48.1 \pm 2.5b,c$	$0.833 \pm 0.003a,b$	$4.21 \pm 0.01c$
SL 5	1	$8.5 \pm 1.6b$	$69.9 \pm 1.8c,d$	$49.7 \pm 0.7b,c$	$0.847 \pm 0.008a,b$	$4.50 \pm 0.02c$
SA 1	3	$4.8 \pm 0.9c$	$68.8 \pm 0.1c,d$	$10.3 \pm 1.7g$	$0.816 \pm 0.001a,b$	$5.18 \pm 0.06b$
SA 2	3	$4.2 \pm 0.1c,d$	$84.5 \pm 1.3a$	$43.4 \pm 2.0c,d$	$0.785 \pm 0.001a,b$	$5.62 \pm 0.04a$
SA 3	2	$7.6 \pm 1.2b$	$60.2 \pm 2.6e$	$48.7 \pm 5.7b,c$	$0.883 \pm 0.003a$	$4.67 \pm 0.04b,c$
SA 4	1	$8.1 \pm 1.1b$	$60.2 \pm 3.3e$	$42.1 \pm 1.2c,d$	$0.882 \pm 0.001a,b$	$4.40 \pm 0.04c$
SA 5	2	$6.3 \pm 1.2b,c$	$71.7 \pm 0.4c$	$38.5 \pm 3.6c,d$	$0.771 \pm 0.006b$	$5.75 \pm 0.02a$
SA 6	3	$6.9 \pm 1.5b,c$	$69.8 \pm 1.4c,d$	$55.6 \pm 1.7b$	$0.791 \pm 0.015a,b$	$4.81 \pm 0.02b,c$
SA 7	1	$7.9 \pm 1.3b$	$65.0 \pm 1.5d,e$	$52.5 \pm 0.3b$	$0.835 \pm 0.004a,b$	$4.63 \pm 0.01b,c$

Data of sausage diameter, dry matter (DM), fat content (g/100 g of DM), water activity ( $a_w$ ) and pH are the mean  $\pm$  standard deviation a, b, c, d, e, f: different letters in the same column indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

<sup>a</sup> CH, chorizo; FU, fuet; MF, mini-fuet, SL, salami; SA, salchichon.

<sup>b</sup> FP: category 1 (<0.50 cm), category 2 (0.51–0.80 cm), category 3 (0.81–1.0 cm) and category 4 (>1.0 cm).

## 2.5. Statistical analysis

An individual dry fermented sausage was the experimental unit for analysis of all data. Time of year, ripening time and brand were not included in the analysis. One-way ANOVA, Duncan's test for multiple mean comparisons, principal component and multiple regression analysis (using a Durbin–Watson statistic tests, at 95% of confidence level) were performed to determine the relationships between data obtained by tensile test, TPA and physico-chemical analysis. The statistical analysis was carried out using Statgraphics Plus version 5.0. The analyses were conducted across all sausages types. Data were presented as the means of each batch and the standard deviation (SD) of the mean.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Physico-chemical analysis

The diameter, dry matter, fat content (% dry matter), water activity ( $a_w$ ) and pH values of the different dry fermented sausages analysed are shown in Table 1. The fuet

(FU) and mini-fuet (MF) samples had very uniform diameters (FU 2.3–3.3 cm, MF about 1 cm), while the other samples had diameters of 2.8–10.5 cm for chorizo (CH), 6.5–12.0 cm for salami (SL) and 4.2–8.1 cm for salchichon (SA). The meat products analysed showed significant differences ( $p < 0.05$ ) for dry matter (60–85%) and fat content (10–72% dry matter). Results showed that the highest dry matter contents ( $p < 0.05$ ) were amongst samples of mini-fuet (MF 2, 3 and 4) with values ranging from 82% to 85%. These samples also showed the lowest diameters and fat contents ( $p < 0.05$ ). The water activity ( $a_w$ ) values of the commercial dry fermented sausages studied (Table 1) ranged from 0.894 to 0.650, and the lowest values ( $p < 0.05$ ) corresponded to samples of mini-fuet. There were significant differences ( $p < 0.05$ ) in pH (Table 1) with those from salami having the lowest values (4.2–4.5). Samples of fuet and mini-fuet showed the highest pH values ranging from 5.24 to 6.65 and around 6.05, respectively. All the estimated parameters are within the normal range described for dry fermented sausages (Kröckel, 1995; Novelli et al., 1998; Ordóñez & Hoz, 2001; Zanardi, Novelli, Ghiretti, & Chizzolini, 2000).

Table 2  
Textural properties of dry fermented sausages

Sample <sup>a</sup>	Breaking strength (N/cm <sup>2</sup> )	Hardness (N)	Adhesiveness ( $N \times s$ )	Cohesiveness	Springiness $10^{-2} \times (m)$	Chewiness (J)
CH 1	10.6 ± 1.2c	164.8 ± 9.7c,d	−1.19 ± 0.32c	0.40 ± 0.06c	0.51 ± 0.02b,c	0.33 ± 0.04c
CH 2	2.8 ± 0.8f	184.8 ± 27.7c	−1.23 ± 0.70c	0.60 ± 0.08a	0.46 ± 0.02c	0.51 ± 0.13b
CH 3	0.7 ± 0.1f	44.4 ± 3.6f	−0.33 ± 0.03e,f	0.40 ± 0.04c	0.26 ± 0.03e	0.05 ± 0.01f
CH 4	1.3 ± 0.4f	82.6 ± 8.1e,f	−0.36 ± 0.23e,f	0.26 ± 0.08e	0.37 ± 0.05d	0.08 ± 0.04e,f
CH 5	0.9 ± 0.1f	69.2 ± 2.5f	−0.62 ± 0.03d,e	0.37 ± 0.01c,d	0.37 ± 0.02d	0.09 ± 0.01e,f
CH 6	8.9 ± 0.9c,d	168.8 ± 25.4c,d	−0.83 ± 0.37d	0.44 ± 0.02b,c	0.65 ± 0.04a	0.48 ± 0.08b
CH 7	3.6 ± 0.9e,f	272.4 ± 37.3a	−0.63 ± 0.03d,e	0.45 ± 0.04b,c	0.67 ± 0.05a	0.81 ± 0.17a
CH 8	2.5 ± 0.4f	108.0 ± 15.5e	−2.48 ± 0.61a	0.40 ± 0.01c	0.45 ± 0.05c	0.19 ± 0.01d,e
CH 9	4.7 ± 0.5e	86.4 ± 3.3e,f	−1.21 ± 0.56c	0.33 ± 0.11d	0.34 ± 0.02d	0.09 ± 0.03e,f
FU 1	20.6 ± 1.8a	88.4 ± 4.7e,f	−1.10 ± 0.35c	0.33 ± 0.03d	0.55 ± 0.03b,c	0.16 ± 0.01d,e
FU 2	9.1 ± 0.4c,d	69.2 ± 4.6e,f	−0.78 ± 0.06d	0.43 ± 0.01b,c	0.66 ± 0.07a	0.20 ± 0.03c,d
FU 3	8.4 ± 0.8c,d	43.1 ± 2.5f	−0.54 ± 0.21e	0.45 ± 0.01b,c	0.52 ± 0.15b,c	0.10 ± 0.03e,f
FU 4	16.5 ± 1.3b	206.3 ± 25.1b,c	−0.91 ± 0.50c,d	0.31 ± 0.02d	0.47 ± 0.12c	0.30 ± 0.10c
FU 5	15.5 ± 1.1b	204.7 ± 20.2b,c	−0.93 ± 0.52c,d	0.33 ± 0.01d	0.49 ± 0.10c	0.33 ± 0.11c
MF 1	17.3 ± 1.3b	177.8 ± 11.0c	−0.45 ± 0.20e,f	0.33 ± 0.03d	0.40 ± 0.06c,d	0.23 ± 0.01c,d
MF 2	7.7 ± 0.6c,d	63.6 ± 10.5c,d	−0.12 ± 0.10f	0.24 ± 0.04e	0.30 ± 0.05d,e	0.05 ± 0.01f
MF 3	16.3 ± 1.2b	165.9 ± 13.0c,d	−0.48 ± 0.19e	0.35 ± 0.03c,d	0.42 ± 0.05c,d	0.24 ± 0.02c,d
MF 4	8.1 ± 0.6c,d	64.1 ± 10.7f	−0.13 ± 0.11f	0.23 ± 0.05e	0.29 ± 0.04d,e	0.04 ± 0.01f
SL 1	18.7 ± 2.5a,b	276.1 ± 13.2a	−1.78 ± 0.20b	0.32 ± 0.06d	0.54 ± 0.03b,c	0.47 ± 0.12b
SL 2	4.3 ± 0.5e	105.8 ± 4.8e	−1.02 ± 0.60c	0.42 ± 0.01c	0.40 ± 0.02c,d	0.18 ± 0.02d,e
SL 3	5.2 ± 0.7d,e	124.2 ± 14.1d,e	−1.19 ± 0.59c	0.42 ± 0.04c	0.67 ± 0.03a	0.35 ± 0.03c
SL 4	4.8 ± 0.6e	99.0 ± 7.4e	−1.90 ± 0.54b	0.45 ± 0.01b,c	0.51 ± 0.05b,c	0.22 ± 0.01c,d
SL 5	4.7 ± 0.2e	98.2 ± 14.7e	−2.48 ± 0.39a	0.43 ± 0.02b,c	0.54 ± 0.03b,c	0.23 ± 0.03c,d
SA 1	7.9 ± 0.6c,d	118.2 ± 7.1d,e	−0.64 ± 0.20d,e	0.41 ± 0.02c	0.48 ± 0.05c	0.23 ± 0.02c,d
SA 2	2.0 ± 0.3f	141.3 ± 11.5d	−0.79 ± 0.32d	0.43 ± 0.04b,c	0.42 ± 0.08c,d	0.25 ± 0.06c,d
SA 3	6.6 ± 0.1d	117.9 ± 7.1d,e	−0.66 ± 0.25d,e	0.54 ± 0.02a	0.49 ± 0.01c	0.31 ± 0.01c
SA 4	3.9 ± 0.4e,f	149.6 ± 14.2d	−0.44 ± 0.21e,f	0.50 ± 0.02b	0.46 ± 0.09c	0.35 ± 0.11c
SA 5	8.4 ± 0.4c,d	144.8 ± 15.0d	−0.16 ± 0.05f	0.48 ± 0.02b	0.41 ± 0.05c,d	0.28 ± 0.02c
SA 6	10.9 ± 1.7c	232.6 ± 20.0b	−1.13 ± 0.51c	0.43 ± 0.02b,c	0.57 ± 0.05b	0.56 ± 0.08b
SA 7	2.5 ± 0.4f	74.4 ± 10.0e,f	−1.45 ± 0.39b,c	0.39 ± 0.01c	0.56 ± 0.04b	0.16 ± 0.01d,e

Data are the mean ± standard deviation a, b, c, d, e, f: different letters in the same column indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

<sup>a</sup> CH, chorizo; FU, fuet; MF, mini-fuet; SL, salami; SA, salchichon.

The dry fermented sausages were grouped according to pH: low acidity ( $>5.5$ ), medium ( $5-5.5$ ) and high acidity ( $<5$ ). According to this criterion, 70% of the samples belonged to medium and high acidity. These differences ( $p < 0.05$ ) could be attributed to variations in the product formulation such as type and amount of meat, fat and sugar, starter culture, etc. (Ibáñez, Quitanilla, Cid, Astiasarán, & Bello, 1996) and ripening process (Liepe, Pueril, & Porobic, 1990).

The dry fermented sausages were also grouped (Table 1) according to the reduction degree or the fat particle diameter (FP). Using this criterion, dry fermented sausages have been classified in four categories according to the FP (Table 1). Category 1 included finely ground meat products with an FP less than 0.50 cm. Categories 2 and 3 corresponded to FP values ranging from 0.51 to 0.80 cm and 0.80 to 1.0 cm, respectively. The products with an FP higher than 1.0 cm belonged to category 4. All salami samples belonged to category 1, mini-fuet samples to category 2, almost all samples of fuet to category 2, salchichon samples were classified into categories 1, 2 and 3. Samples of chorizo (CH 1, CH 3, CH 4, CH 5, CH 6 and CH 7) showed the maximum FP (category 4), although one chorizo sample belonged to category 1, indicating a very heterogeneous reduction degree for the manufacture of these products.

### 3.2. Textural analysis

Textural properties of dry fermented sausages are shown in Table 2. Results from the tensile and TPA analysis showed many variations ( $p < 0.05$ ) indicating a great data dispersion for all the parameters studied. The breaking strength ranged between 0.7 and 11 N/cm<sup>2</sup> in 80% of the dry fermented sausages studied and the lowest breaking strength ( $p < 0.05$ ) was observed in samples of chorizo and salchichon. Hardness ranged from 69 to 272 N, with around 60% of the analysed dry fermented sausages showing values higher than 100 N (Table 2). Around 50% of dry fermented sausages showed adhesiveness values between  $-0.6$  and  $-1.3$  N s. Half of the analysed dry fermented sausages showed cohesiveness values between 0.40 and 0.45. Springiness values were less varied with 70% of samples ranging from 0.4 to 0.6  $10^{-2}$  m. Approximately, 56% of the chewiness values for dry fermented sausages ranged from 0.15 to 0.40 J. The range of TPA values shown in Table 2 included those reported by some authors for different dry fermented sausages (Bruna et al., 2000; Gimeno et al., 2000; Herranz, Hoz, Hierro, Fernandez, & Ordoñez, 2005; Muguerza, Ansorena, & Astiasaran, 2003).

After applying principal components analysis using the data obtained from the analysis of the textural properties of dry fermented sausages (Table 2) as criterion of association, it was possible to distinguish four different clusters. The mean values of each textural property of the different sausages included in each cluster was calculated and then plotted. As revealed in Fig. 2, four different textural pro-

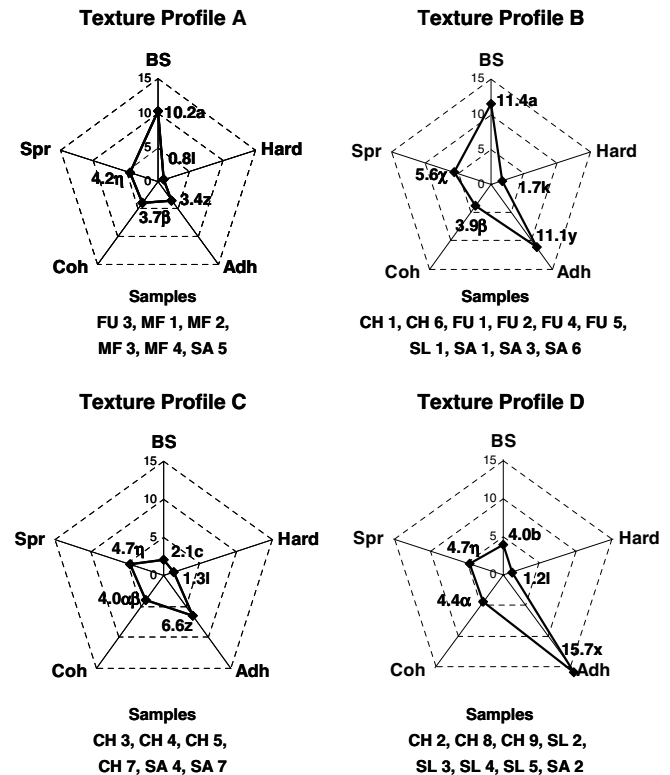


Fig. 2. Textural profiles (A, B, C and D) and mean values of different textural parameters from dry fermented sausages (CH, chorizo; FU, fuet; MF, mini-fuet; SL, salami; SA, salchichon). BS: breaking strength (N/cm<sup>2</sup>), Hard: hardness [(N)  $\times 10^{-2}$ ], Adh: adhesiveness [(N  $\times$  s)  $\times (-10)$ ], Coh: cohesiveness ( $\times 10$ ), Spr: springiness [(m)  $\times 10^{-3}$ ]. Mean values with different letter differs significantly ( $p < 0.05$ ): a, b, c for BS; k, l for Hard; x, y, z for Adh;  $\alpha$ ,  $\beta$  for Coh;  $\chi$ ,  $\eta$  for Spr.

Table 3

Dry matter (DM), fat content, water activity ( $a_w$ ) and pH of the dry fermented sausages analysed grouped according to the textural profiles (A, B, C and D)

Textural profiles	DM (%)	Fat content (% DM)	$a_w$	pH
A	76.9 $\pm$ 2.3a	30.1 $\pm$ 3.9b	0.726 $\pm$ 0.018b	5.92 $\pm$ 0.17a
B	70.3 $\pm$ 1.5b	39.8 $\pm$ 2.7a	0.834 $\pm$ 0.011a	5.12 $\pm$ 0.11b
C	67.1 $\pm$ 1.9b	44.1 $\pm$ 3.2a	0.832 $\pm$ 0.014a	4.75 $\pm$ 0.14c
D	70.3 $\pm$ 1.7b	44.7 $\pm$ 3.0a	0.836 $\pm$ 0.013a	4.74 $\pm$ 0.12c

Data are the mean  $\pm$  standard deviation a, b, c: different letters in the same column indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

files, arbitrarily named A, B, C and D, were obtained (Fig. 2). These profiles showed significant ( $p < 0.05$ ) differences for textural properties, mainly for breaking strength and adhesiveness (Fig. 2). Profile A showed a high breaking strength and low adhesiveness. The meat products included in this textural profile were those of the highest ( $p < 0.05$ ) pH and dry matter, while the values of  $a_w$  and fat content were significant lower (Table 3). Textural profile B (Fig. 2) had high breaking strength, hardness and springiness, intermediate adhesiveness and low cohesiveness. The products showing this textural profile were characterized by

high values (Table 3) of  $a_w$  and fat content ( $p < 0.05$ ), intermediate acidity ( $p < 0.05$ ) and low dry matter. Textural profile C could be defined by the lowest breaking strength, hardness and springiness and low adhesiveness ( $p < 0.05$ ). Textural profile D showed the highest adhesiveness and intermediate breaking strength (Fig. 2). The dry fermented sausages corresponding to textural profiles C and D showed similar physico-chemical characteristics with low acidity ( $p < 0.05$ ) and dry matter and high values (Table 3) of  $a_w$  and fat content ( $p < 0.05$ ).

Results (Fig. 2) also indicated that salchichon is a very heterogeneous product because it is included in the four textural profiles. Chorizo samples were mainly grouped in profiles B, C and D, although the majority (44%) of samples belonged to profile C. Salami and fuet samples were more homogenous since 80% of them belonged to profiles D and B, respectively (the remainder corresponded to B

and A, respectively). Only the mini-fuet samples were included in profile A.

### 3.3. Multiple linear regression analysis

The multiple linear regression analyses, using the different textural properties as dependent variables and values from physico-chemical analysis as independent variables, revealed a significant relation (Table 4) between breaking strength ( $R^2 = 0.294$ ,  $p < 0.005$ ), cohesiveness ( $R^2 = 0.306$ ,  $p < 0.005$ ), adhesiveness ( $R^2 = 0.282$ ,  $p < 0.005$ ), springiness ( $R^2 = 0.216$ ,  $p < 0.05$ ) versus  $a_w$ , pH, DM and fat content. However, the statistical significance of the  $t$ -value indicates that only  $a_w$  and pH play an important role in the breaking strength, dry matter is important in cohesiveness and springiness, and pH and dry matter in adhesiveness. A significant relationship ( $R^2 = 0.284$ ,  $p < 0.0005$ )

Table 4

Multiple linear regression analysis of different textural properties versus water activity ( $a_w$ ), pH, dry matter (DM), fat content (% DM) and size of fat particles (FP) and versus some textural properties of dry fermented sausages

Dependent variable	$R^2$	SE	Independent variable	Regression coefficient	$t$ -Values	$\beta$ -Values
Cohesiveness	0.306**	0.007	Constant	0.730		
			$a_w$	0.028	0.108	0.020
			pH	0.002	0.076	0.015
			DM	-0.006	-2.807*	-0.500
			Fat content	0.001	1.027	0.140
Adhesiveness	0.282**	0.006	Constant	1.186		
			$a_w$	-2.717	-1.279	-0.231
			pH	0.527	2.440*	0.444
			DM	-0.036	-2.079*	-0.348
			Fat content	-0.001	-0.068	-0.016
Hardness	0.023	0.641	Constant	98.164		
			$a_w$	102.365	0.445	0.104
			pH	3.648	0.156	0.037
			DM	-0.978	-0.523	-0.114
			Fat content	-0.163	-0.136	-0.032
Springiness	0.216*	0.001	Constant	0.008		
			$a_w$	0.002	0.529	0.124
			pH	0.9.10-4	0.231	0.056
			DM	-0.7.10-4	-2.368*	-0.496
			Fat content	-0.5.10-5	-0.257	-0.060
FP	0.284***	0.001	Constant	3.358		
			Breaking strength	-0.048	-1.928*	-0.200
			Cohesiveness	-1.165	-0.764	-0.087
			Adhesiveness	0.774	4.899****	0.496
			Hardness	0.004	2.217*	0.213
			Springiness	4.189	0.038	0.004
Breaking strength	0.294**	0.046	Constant	-46.433		
			$a_w$	31.846	2.018*	0.416
			pH	5.267	3.205**	0.684
			DM	0.042	0.316	0.062
			Fat content	-0.055	-0.733	-0.138

SE = standard error.

$R^2$  = Coefficient of determination (correlation coefficient square).

\*  $p < 0.05$ .

\*\*  $p < 0.005$ .

\*\*\*  $p < 0.0005$ .

\*\*\*\*  $p < 0.00005$ ;  $n = 90$ .



Table 5

Multiple linear regression analysis of breaking strength versus texture profile analysis (TPA) parameters of dry fermented sausages

Dependent variable	$R^2$	SE	Independent variable	Regression coefficient	$t$ -Values	$\beta$ -Values
Cohesiveness	0.266***	0.007	Constant	0.290		
			Breaking strength	−0.009	−4.273***	−0.504
			Adhesiveness	0.009	0.735	0.078
			Hardness	0.0005	2.703*	0.359
			Springiness	27.910	3.420**	0.328
Adhesiveness	0.132*	0.007	Constant	−0.314		
			Breaking strength	0.045	1.971*	0.292
			Cohesiveness	0.801	0.735	0.093
			Hardness	−0.003	−1.797	−0.250
			Springiness	−210.104	−2.682*	−0.287
Hardness	0.407****	0.482	Constant	−4.830		
			Breaking strength	8.395	6.500****	0.655
			Cohesiveness	193.798	2.703**	0.270
			Adhesiveness	−14.158	−1.797	−0.170
			Springiness	−3737.650	−0.664	−0.061
Springiness	0.276***	0.001	Constant	0.002		
			Breaking strength	0.0001	3.232***	0.476
			Cohesiveness	0.005	3.420***	0.425
			Adhesiveness	−4.10 <sup>−4</sup>	−2.682**	−0.293
			Hardness	−1.6.10 <sup>−6</sup>	−0.664	−0.098
Breaking strength <sup>a</sup>	0.634****	0.026	Constant	−0.777		
			Cohesiveness	−16.881	−4.359****	−0.302
			Adhesiveness	0.728	1.686*	0.112
			Hardness	0.042	7.403****	0.538
			Springiness	1884.61	6.044****	0.400

SE = standard error.

 $R^2$  = coefficient of determination (correlation coefficient square).<sup>a</sup> Multiple linear regression model: breaking strength =  $-0.777 + 0.728 \times \text{adhesiveness} - 16.881 \times \text{cohesiveness} + 1884.61 \times \text{springiness} + 0.042 \times \text{hardness}$ .\*  $p < 0.05$ .\*\*  $p < 0.005$ .\*\*\*  $p < 0.0005$ .\*\*\*\*  $p < 0.00005$ ;  $n = 90$ .

was found between fat particle diameter (FP) and breaking strength, cohesiveness, adhesiveness and hardness (Table 4). Results of Student's  $t$ -values confirm that only breaking strength and adhesiveness are significant ( $p < 0.05$ ) correlated with FP. However, the  $\beta$ -values (Table 4) indicate that adhesiveness is more affected than other textural parameters by the FP.

Table 5 shows the significant multiple linear regression analyses of the cohesiveness ( $R^2 = 0.266$ ,  $p < 0.0005$ ), adhesiveness ( $R^2 = 0.132$ ,  $p < 0.05$ ), hardness ( $R^2 = 0.407$ ,  $p < 0.00005$ ), springiness ( $R^2 = 0.276$ ,  $p < 0.0005$ ) versus TPA parameters and breaking strength (BS). The statistical significance of the Student  $t$ -value indicates that only BS ( $p < 0.0005$ ), hardness ( $p < 0.05$ ) and springiness ( $p < 0.005$ ) play an important role in cohesiveness, BS ( $p < 0.05$ ) and springiness ( $p < 0.05$ ) are important in adhesiveness, BS ( $p < 0.0005$ ) and cohesiveness ( $p < 0.005$ ) are important in hardness and BS ( $p < 0.005$ ), cohesiveness ( $p < 0.005$ ) and adhesiveness ( $p < 0.005$ ) in springiness.

A high significant multiple linear regression ( $R^2 = 0.634$ ,  $p < 0.00005$ ) was found between breaking strength and TPA parameters (Table 5). All the Student's  $t$ -values of cohesiveness, adhesiveness, hardness and springiness par-

tial regression coefficients were significant [BS versus cohesiveness ( $p < 0.00005$ ), BS versus adhesiveness ( $p < 0.05$ ), BS versus hardness ( $p < 0.00005$ ), BS versus springiness ( $p < 0.005$ )]. In addition,  $\beta$ -values suggest that hardness plays a more important role than the other TPA parameters in breaking strength followed by cohesiveness. The resulting regression model was  $BS = -0.777 + 0.728 \times \text{adhesiveness} - 16.881 \times \text{cohesiveness} + 1884.61 \times \text{springiness} + 0.042 \times \text{hardness}$ . The correlation coefficient  $R$  was 0.796, the  $R^2$  adjusted for degrees of freedom 0.61, and the mean absolute error was 0.021. Results of the multivariate analysis confirm that all of the TPA parameters chosen were relevant for constructing regression models to predict BS. The model of prediction could permit the calculation of breaking strength of dry fermented sausages using the cylindrical probe of the TPA.

#### 4. Conclusions

The determination of breaking strength by tensile test can be used together with the TPA, to determine textural properties of dry fermented sausages. Both analyses produced complementary information which permits these

meat products to be grouped into four different textural profiles. These textural profiles are characterized by the values of breaking strength, hardness, adhesiveness, cohesiveness and springiness (mainly breaking strength and adhesiveness). The meat products included in each textural profile showed different physico-chemical characteristics such as pH,  $a_w$ , dry matter and fat content.

The multivariate analysis confirms that TPA parameters (cohesiveness, adhesiveness, hardness and springiness) could be used to construct regression models to predict breaking strength.

## Acknowledgements

This work was funded by the Project AGL04-6773. A.M. Herrero was supported by a Contract from the *Juan de la Cierva* Program and M.D. Romero de Avila was awarded a Grant, from the Ministerio de Educación y Ciencia.

## References

- Bourne, M. C., (2002). Principles of objective texture measurement. In M. C. Bourne, (Ed.), *Food texture and viscosity: Concept and measurement*. San Diego, USA, pp. 107–188.
- Bourne, M. C. (1978). Texture profile analysis. *Food Technology*, 32, 62–66.
- Bruna, J. M., Fernández, M., Hierro, E. M., Ordoñez, J. A., & de la Hoz, L. (2000). Combined use of pronase E and a fungal extract (*Penicillium aurantiogriseum*) to potentiate the sensory characteristics of dry fermented sausages. *Meat Science*, 54, 135–145.
- Christensen, M., Purslow, P. P., & Larsen, L. M. (2000). The effect of cooking temperature on mechanical properties of whole meat, single muscle fibres and perimysial connective tissue. *Meat Science*, 55, 301–307.
- Christensen, M., Young, R. D., Lawson, M. A., Larsen, L. M., & Purslow, P. P. (2003). Effect of added  $\mu$ -calpain and post-mortem storage on the mechanical properties of bovine single muscle fibres extended to fracture. *Meat Science*, 66, 105–112.
- Gimeno, O., Ansorena, D., Astiasarán, I., & Bello, J. (2000). Characterization of chorizo de Pamplona: Instrumental measurements of colour and texture. *Food Chemistry*, 69, 195–200.
- Hanson, S. W. F., & Olley, J. (1963). Application of the Blight and Dyer method of lipid extraction to tissue homogenates. *Biochemical Journal*, 89, 101–120.
- Herranz, B., Hoz, L., Hierro, E., Fernandez, M., & Ordoñez, J. A. (2005). Improvement of the sensory properties of dry-fermented sausages by the addition of free amino acids. *Food Chemistry*, 91, 673–682.
- Honikel, K. O. (1998). Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat Science*, 49, 447–457.
- Houben, J. H., & van't Hooft, B. J. (2005). Variations in product-related parameters during standardised manufacture of a semi-dry fermented sausage. *Meat Science*, 69, 283–287.
- Hoz, L., D'Arrigo, M., Cambero, I., & Ordoñez, J. A. (2004). Development of an n-3 fatty acid and  $\alpha$ -tocopherol enriched dry fermented sausage. *Meat Science*, 67, 485–495.
- Ibáñez, C., Quitanilla, L., Cid, C., Astiasarán, I., & Bello, J. (1996). Dry fermented sausages elaborated with *Lactobacillus plantarum*-*Staphylococcus carnosus* part I: Effect of partial replacement of NaCl with KCl on the stability and the nitrosation process. *Meat Science*, 44, 227–234.
- Kilcast, D. (2004). Force/deformation techniques for measuring texture. In D. Kilcast (Ed.), *Texture in Food* (Vol. 2, pp. 109–145). Abington, Cambridge (UK): Woodhead Publishing Ltd.
- Kröckel, L., (1995). Bacterial fermentation of meats. In G. Campbell-Patt, P. E. Cook (Eds.), *Fermented Meats*. Glasgow. U.K. (pp. 69–109).
- Lepetit, J., & Culioli, J. (1994). Mechanical properties of meat. *Meat Science*, 36, 203–237.
- Lewis, G. J., & Purslow, P. P. (1989). The strength and stiffness of perimysial connective tissue isolated from cooked beef muscle. *Meat Science*, 26, 255–269.
- Liepe, H., Pueril, E., & Porobic, R. (1990). Influence of sugars and bacteria on dry sausage souring. *Fleischwirtschaft*, 70, 189–192.
- Mendoza, E., García, M. L., Casas, C., & Selgas, M. D. (2001). Inulin as fat substitute in low fat, dry fermented sausages. *Meat Science*, 57, 387–393.
- Muguerza, E., Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2003). Improvement of nutritional properties of chorizo de Pamplona by replacement of pork backfat with soy oil. *Meat Science*, 65, 1361–1367.
- Muguerza, E., Gimeno, O., Ansorena, D., Bloukas, J. G., & Astiasarán, I. (2001). Effect of replacing pork back fat with pre-emulsified olive oil on lipid fraction and sensory quality of Chorizo de Pamplona – a traditional Spanish fermented sausages. *Meat Science*, 59, 251–258.
- Mutungi, G., Purslow, P., & Warkup, C. (1995). Structural and mechanical changes in raw and cooked single porcine muscle fibres extended to fracture. *Meat Science*, 40, 217–234.
- Mutungi, G., Purslow, P., & Warkup, C. (1996). Influence of temperature, fibre diameter and conditioning on the mechanical properties of single muscle fibres extended to fracture. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 72, 359–366.
- Novelli, E., Zanardi, E., Ghiretti, G. P., Campanini, G., Dazzi, G., Madarena, G., et al. (1998). Lipid and cholesterol oxidation in frozen stored pork salame Milano and mortadella. *Meat Science*, 48, 29–40.
- Ordóñez, J. A., Hoz, L., (2001). Embutidos crudos curados. Tipos. Fenómenos madurativos. Alteraciones. In Martín & Macías, *Enciclopedia de la carne y de los productos cárnicos* Vol. II. (pp. 1063–1090). Cáceres, Spain.
- Scott-Blair, G. W. (1958). Rheology in food research. *Advances in Food Research*, 8, 1–61.
- Visessanguan, W., Soottawat, B., Riebroy, S., & Thepkasikul, P. (2004). Changes in composition and functional properties of proteins and their contributions to Nham characteristics. *Meat Science*, 66, 579–588.
- Willems, M. E. T., & Purslow, P. P. (1996). Effect of postrigor sarcomere length on mechanical and structural characteristics of raw and heat-denatured single porcine muscle fibres. *Journal of Texture Studies*, 27, 217–233.
- Zanardi, E., Novelli, E., Ghiretti, G. P., & Chizzolini, R. (2000). Oxidative stability of lipids and cholesterol in salame Milano, coppa and Parma ham: Dietary supplementation with vitamin E and oleic acid. *Meat Science*, 55, 169–175.

**ARTÍCULO 1.2.**

**Tensile properties of cooked meat sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) parameters and physico-chemical characteristics**

**Meat Science. (2008). 80 (3), 690 – 696.**







## Tensile properties of cooked meat sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) parameters and physico-chemical characteristics

A.M. Herrero<sup>a</sup>, L. de la Hoz<sup>a</sup>, J.A. Ordóñez<sup>b</sup>, B. Herranz<sup>a</sup>, M.D. Romero de Ávila<sup>a</sup>, M.I. Cambero<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Instituto de Ciencia y Tecnología de la Carne, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 11 July 2007

Received in revised form 22 February 2008

Accepted 10 March 2008

#### Keywords:

Tensile test

Texture profile analysis

Breaking strength

Energy to fracture

Folding test

Cooked meat sausages

### ABSTRACT

The possibilities of using breaking strength (BS) and energy to fracture (EF) for monitoring textural properties of some cooked meat sausages (chopped, mortadella and galantines) were studied. Texture profile analysis (TPA), folding test and physico-chemical measurements were also performed. Principal component analysis enabled these meat products to be grouped into three textural profiles which showed significant ( $p < 0.05$ ) differences mainly for BS, hardness, adhesiveness and cohesiveness. Multivariate analysis indicated that BS, EF and TPA parameters were correlated ( $p < 0.05$ ) for every individual meat product (chopped, mortadella and galantines) and all products together. On the basis of these results, TPA parameters could be used for constructing regression models to predict BS. The resulting regression model for all cooked meat products was  $BS = -0.160 + 6.600 \times \text{cohesiveness} - 1.255 \times \text{adhesiveness} + 0.048 \times \text{hardness} - 506.31 \times \text{springiness}$  ( $R^2 = 0.745$ ,  $p < 0.00005$ ). Simple linear regression analysis showed significant coefficients of determination between BS ( $R^2 = 0.586$ ,  $p < 0.0001$ ) versus folding test grade (FG) and EF versus FG ( $R^2 = 0.564$ ,  $p < 0.0001$ ).

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

In recent years, consumers have demanded meat products that are safe, nutritious, convenient, rich in variety, attractive (in appearance, texture, odour and taste) and innovative. This stimulates interest in manufacturing cooked meat sausages by using new technologies and formulations, using different types of meat (pork, beef, poultry) and reducing levels of phosphate, salt and fat, all of which lead to beneficial effects on health (Desmond, 2006; Kemi, Karkkainen, & Lamberg-Allardt, 2006). These modifications in the manufacture of cooked meat sausages may affect the quality of the products (Farouk, Hall, Harrison, & Swan, 1999; Jiménez-Colmenero, 2000; Ruusunen & Puolanne, 2005), particularly texture (Jiménez-Colmenero, 2000).

Many instrumental methods have been developed to determine food textural properties (Bourne, 2002; Kilcast, 2004). Nowadays, the most commonly used instrumental method is, probably, the compression method of texture profile analysis (TPA), which mimics the conditions to which the material is subjected throughout the mastication process (Bourne, 1978; Scott-Blair, 1958).

The compression parameters obtained with TPA have been employed on cooked meat sausages by many authors as indices

to determine the quality of the finished product or to determine the textural property modifications due to new formulations (García, Cáceres, & Selgas, 2006; Kerr, Wang, & Choi, 2005; Mor-Mur & Yuste, 2003; Yilmaz, Simsek, & Isikli, 2002). However, the use of others texture instrumental methods could provide complementary valuable information about cooked meat sausages. For this, a textural instrumental method, the so-called tensile test, based on resistance of the sample to force deformation, has been developed (Bourne, 2002). Several tensile parameters can be obtained such as the maximum rupture force (maximum peak height resisted by the material), breaking strength (maximum rupture force by the cross-sectional area of the product) and energy to fracture (area under the deformation curve) (Bourne, 2002; Honikel, 1998).

The tensile test has been used to study the mechanical properties of whole meat, single muscle fibres and perimysial connective tissue (Christensen, Purslow, & Larsen, 2000; Christensen, Young, Lawson, Larsen, & Purslow, 2003; Lepetit & Culioli, 1994; Lewis & Purslow, 1989; Mutungi, Purslow, & Warkup, 1995; Willems & Purslow, 1996). Recently, the tensile test has been successfully used on meat products to obtain more textural property information on fermented sausages (Herrero et al., 2007) and meat spaghetti (Farouk, Zhang, & Waller, 2005). Tensile properties, such as breaking strength and energy to fracture, are important parameters of quality in meat sausages due to the increasing tendency of marketing previously sliced products. These slices can break easily during handling, processing and packing. If the

\* Corresponding author. Address: Departamento Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 913943745; fax: +34 913943743.

E-mail address: [icambero@vet.ucm.es](mailto:icambero@vet.ucm.es) (M.I. Cambero).

breaking strength or the energy to fracture were less than the superficial adhesion force between the product and the surface of the processing equipment an important problem could arise because many of products could break leading to problems that can result in the processing line being stopped. Another undesirable example is when the force of adhesion of the product to packaging material or to another slice of the product is higher than the breaking strength or the energy to fracture because this results in distortion, disfigurement and breakage of the product, producing adverse reactions in consumers. These problems could occur in different meat products such as cooked meat sausages when they are sliced and vacuum packaged. However, no reports have been found about tensile measurements in these cooked meat products.

Therefore, the primary aim of this work was to apply tensile tests to cooked meat sausages to determine their tensile parameters (breaking strength and energy to fracture) and relating these results to those of TPA parameters, folding test score and physico-chemical characteristics, in order to provide a complete characterization of these products. Once the relationship between tensile and TPA parameters is established, multiple linear regression can be used to predict the tensile parameters using the TPA results as predictor variables. Thus, with a simple test (TPA) it should be possible to obtain data of tensile and compression textural parameters for cooked meat sausages.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Description of the samples

Twenty-four samples (0.5 kg for each sample, vacuum packaged) of three different types of cooked meat sausages (chopped, mortadella and galantines) from different commercial brands were purchased in retail shops in Spain. The 24 samples were

bought three times (January, May and October) maintaining brands and meat sausage type. At every time of purchase, eight samples were of chopped (CH), nine of mortadella (MT), and seven of galantines (GL). Chopped is a heat-cured meat sausage manufactured with a mixture of ham chunks and trimmings and seasonings, ground together and then packaged into loaves. Mortadella is a finely hashed/ground heat-cured meat sausage which incorporates spices (including black pepper, myrtle berries, nutmeg and coriander) and sometimes small cubes of pork fat (principally the hard fat from the neck of the pig). A galantine is a French dish of boned stuffed meat, most commonly poultry or fish, that is poached and served cold, coated with aspic. Table 1 shows the meat origin, diameter and slice appearance of the different cooked meat sausages studied. The samples were kept at 5 °C until analysis. All the sausages were subjected to each type of physical, chemical and textural analysis.

### 2.2. Physico-chemical analysis

After removing the plastic case, chemical analyses were made in duplicate on all cooked sausages. About 200 g of sample were finely cut and some aliquots were used for the different analyses. The pH was determined in a distilled water homogenate (1:10) (w/v) of the sample (10 g) using a Crison Digit-501 pH meter (Crison Instruments LTD, Barcelona, Spain). Dry matter (DM) was determined by drying the sample at 110 °C to constant weight and the results are expressed as a percentage. Water activity ( $a_w$ ) was measured using a Decagon CX1 hygrometer (Decagon Devices Inc., Pullman, WA, USA) at 25 °C. The total fat content of the samples was determined by cold extraction in chloroform and methanol in the presence of antioxidant BHT as described by Hanson and Olley (1963) and was quantified gravimetrically. Results are expressed as percentage of dry matter (DM).

**Table 1**  
Characteristics of the cooked meat sausages analysed

Sample <sup>a</sup>	Product	Meat origin	Diameter (cm)	Slice appearance
CH1	Chopped	Pork	5.5 ± 0.2	~60% fine emulsion with coarse meat (0.5–2 cm <sup>2</sup> )
CH2	Chopped	Turkey	10.0 ± 0.4	
CH3	Chopped	Beef	5.0 ± 0.3	
CH4	Chopped	Iberian pork	5.0 ± 0.2	~70% fine emulsion with flat strip meat (0.5 × 1.5 cm) and coarse fat
CH5	Chopped	Pork	6.0 ± 0.2	~55% fine emulsion with coarse meat (1–1.5 cm <sup>2</sup> )
CH6	Chopped	Pork	10.5 ± 0.5	~80% fine emulsion with coarse meat (0.5–2 cm <sup>2</sup> )
CH7	Chopped	Iberian pork	10.0 ± 0.5	~60% fine emulsion with irregular coarse meat (0.3–2 cm <sup>2</sup> )
CH8	Chopped	Pork	10.0 ± 0.4	~40–50% fine emulsion with cubes of meat and fat (~1 cm <sup>2</sup> )
MT1	Mortadella	Pork	10.0 ± 0.3	~80% fine emulsion with green-olives
MT2	Mortadella	Iberian pork	6.0 ± 0.2	~70% fine emulsion with cubes of fat (~1 cm <sup>2</sup> )
MT3	Mortadella	Pork and beef (traditional type)	5.3 ± 0.2	
MT4	Mortadella	Pork and beef (traditional type)	5.5 ± 0.3	
MT5	Mortadella	Iberian pig	5.7 ± 0.2	~60–65% fine emulsion with coarse meat (0.1–0.3 cm <sup>2</sup> )
MT6	Mortadella	Turkey	5.8 ± 0.2	~65–70% fine emulsion with coarse meat (~0.1–0.3 cm <sup>2</sup> )
MT7	Mortadella	Pork	16.0 ± 0.5	~65–70% fine emulsion with cubes of fat (~0.25 cm <sup>2</sup> )
MT8	Mortadella	Turkey	11.5 ± 0.4	~65% fine emulsion and coarse meat (0.01–0.1 cm <sup>2</sup> ). Foamy aspect and many small cavities
MT9	Mortadella	Turkey	12.5 ± 0.3	~60% fine emulsion with coarse meat (~0.05–0.5 cm <sup>2</sup> )
GL1	Galantine	Pork and fish	11.5 ± 0.4	~80% fine emulsion with kamaboko (cube pieces ~2.25 cm <sup>2</sup> )
GL2	Galantine	Chicken	17.5 ± 0.4	~10–15% fine emulsion with coarse meat (1–2 cm <sup>2</sup> ) and pistachio nut
GL3	Galantine	Chicken	11.0 ± 0.4	~10% fine emulsion with irregular meat portions (~1–12 cm <sup>2</sup> )
GL4	Galantine	Duck	12.0 ± 0.5	~60–70% fine emulsion with irregular coarse meat (~4–12 cm <sup>2</sup> )
GL5	Galantine	Chicken	15.0 ± 0.5	~65% fine emulsion with irregular coarse meat (~0.5–8 cm <sup>2</sup> ) with fine/coarse fat and herbs
GL6	Galantine	Pork and fish	11.0 ± 0.4	~30% fine emulsion with irregular kamaboko portions (~1–16 cm <sup>2</sup> ) and fine/coarse red pepper
GL7	Galantine	Chicken	12.0 ± 0.3	~60% fine emulsion with irregular coarse meat (~0.5–4 cm <sup>2</sup> )

<sup>a</sup> CH = chopped, MT = mortadella, GL = galantine.

### 2.3. Textural analysis

Texture profile analysis (TPA), tensile test and folding tests were carried out at about 22 °C. All textural procedures involved discarding the external plastic case of the cooked sausages.

TPA and tensile test were performed using a TA.XT2i SMS Stable Micro Systems Texture Analyser (Stable Microsystems Ltd., Surrey, England) with the *Texture Expert* programmes.

#### 2.3.1. Texture profile analysis (TPA)

In general, four cylinders 1.5 cm high and 2 cm wide were prepared from every sample. A double compression cycle test was performed up to 50% compression of the original portion height with an aluminium cylinder probe of 2 cm diameter. A time of 5 s was allowed to elapse between the two compression cycles. Force–time deformation curves were obtained with a 25 kg load cell applied at a cross-head speed of 2 mm/s. The following parameters were quantified (Bourne, 1978): hardness (N) maximum force required to compress the sample, springiness (m), ability of the sample to recover its original form after deforming force was removed, adhesiveness (N s), area under the abscissa after the first compression, and cohesiveness, extent to which the sample could be deformed prior to rupture.

#### 2.3.2. Tensile test

In general, five pieces were cut in a dumbbell shape, approximately 7.5 cm long, 2 cm wide in the narrowest zone and 0.2 cm thickness per sample. A load cell of 5 kg was employed. For analysis, one tensile grip (A/TGT) was fixed to the base of the textural analyser, while the other one was attached to the load cell. Initial grip separation was 12.5 mm and cross-head speed was 1.0 mm/s until rupture (Herrero et al., 2007). Each sample was placed between both tensile grips on the textural analyzer. Rupture force was taken as the maximum force peak height (N) required for breaking the sample. Breaking strength (N/cm<sup>2</sup>) was obtained dividing the rupture force by the cross-sectional area (thickness × width) of the portions. Energy to fracture (N mm) was calculated as the area under the deformation curve (Honikel, 1998).

#### 2.3.3. Folding test

This test was conducted by folding a 3 mm thick slice of meat sausage slowly in half, and then in half again to examine the structural failure of the sample. The evaluation was performed in accordance with a five-point grade system (Suzuki, 1981) as follows: grade (5), no crack when folded into quadrants; grade (4), no crack when folded in half; grade (3), crack develops gradually when folded in half; grade (2), crack develops immediately when folded in half; grade (1), crumbles when pressed by finger.

### 2.4. Statistical analysis

An individual cooked meat sausage was the experimental unit for analysis of all data. To check the normal distribution (90% confidence) of samples, the Shapiro–Wilks test was applied. When samples fitted the normal distribution, one-way ANOVA analysis was performed. When samples did not fit the normal distribution, the Kruskal–Wallis test was used to test the null hypothesis that the medians of variables within each of the levels of samples were the same. Duncan's test to multiple mean comparisons (at 95% or 99% of confidence level), Pearson product moment correlations, principal component, simple and multiple regression analysis (using a Durbin–Watson statistic tests, at 95% of confidence level) were performed to determine the relationships between data obtained by tensile test, TPA and physico-chemical analysis. The statistical analysis was carried out using a Statgraphics Plus version 5.0. The analyses were conducted across all sausages types. Data

were presented as the mean of each sample and the standard deviation (SD) of the mean.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Physico-chemical analysis

Dry matter, fat content (% dry matter), water activity ( $a_w$ ) and pH values of the different cooked sausages are shown in Table 2. Significant differences ( $p < 0.01$ ) in all these physico-chemical parameters were found (Table 2). These differences ( $p < 0.01$ ) could be attributed to variations in the product formulation (Table 1) and probably are not due to the type of cooked meat sausage. Results show that dry matter ranged from 28.1% to 49.1% wet matter and fat contents varied from 19.2% to 50.3% dry matter (Table 2). In general, galantines had low dry matter and fat values (Table 2) with values close to that reported by others authors (Mielnik, Aaby, Rolfsen; Ellekjær, & Nilsson, 2002; Yilmaz et al., 2002). The cooked sausages analysed (Table 1) could be grouped according to fat content as: low fat (<25%), medium fat (25–35%) and high fat (>35%). According to this criterion, only 8.3% of the samples belonged to the low fat group, 33.3% to the medium fat category, and 58.4% to the high fat group. Samples of chopped and galantines were distributed in all three groups, although, in general, chopped samples showed higher fat content than galantines. It was also observed that almost all mortadella samples were classified as high fat.

The water activity and pH values of the commercial cooked products studied ranged from 0.946 to 0.986 and 6.58 to 7.05, respectively.

### 3.2. Textural analysis

Textural properties of the cooked meat sausages are shown in Table 3. Results from the tensile and TPA analysis showed significant variations ( $p < 0.05$ ) indicating a great dispersion of textural properties between all samples studied. The breaking strength (BS) and energy to fracture (EF) fell between 0.03 and 4.67 N/cm<sup>2</sup>

**Table 2**

Dry matter (DM, % wet matter), fat content (% DM), water activity ( $a_w$ ) and pH of cooked meat sausages

Samples <sup>A</sup>	DM	Fat content	$a_w$	pH
CH1	49.1 ± 0.5a	41.6 ± 1.6a,b	0.960 ± 0.001c,d	6.62 ± 0.14c
CH2	28.1 ± 0.5e	19.2 ± 1.4e	0.978 ± 0.001a,b	6.65 ± 0.14b,c
CH3	34.1 ± 2.2c,d	34.8 ± 4.0c	0.974 ± 0.001a,b	6.63 ± 0.10c
CH4	45.2 ± 0.7a,b	46.8 ± 1.1a	0.966 ± 0.001c	6.81 ± 0.14b,c
CH5	35.9 ± 1.4c	34.8 ± 0.5c	0.975 ± 0.001a,b	6.63 ± 0.02c
CH6	33.9 ± 1.4c,d	42.2 ± 3.0a,b	0.966 ± 0.001c	6.75 ± 0.21b,c
CH7	42.3 ± 0.4b	50.3 ± 1.9a	0.959 ± 0.003c,d	6.88 ± 0.04a
CH8	33.2 ± 1.3c,d	36.8 ± 3.3b	0.971 ± 0.002 b	6.72 ± 0.02b,c
MT1	33.7 ± 0.1c,d	43.8 ± 1.6a	0.969 ± 0.001b,c	6.65 ± 0.02b,c
MT2	39.8 ± 0.1b,c	45.8 ± 0.5a	0.980 ± 0.001a	6.75 ± 0.03b,c
MT3	37.1 ± 0.7c	41.6 ± 0.6a,b	0.970 ± 0.001b	6.76 ± 0.05b,c
MT4	37.2 ± 0.8c	49.2 ± 0.5a	0.970 ± 0.001b	6.76 ± 0.05b,c
MT5	31.1 ± 1.6d	44.4 ± 5.1a	0.974 ± 0.001a,b	7.05 ± 0.04a
MT6	27.8 ± 0.1e	35.3 ± 2.1c	0.977 ± 0.001a,b	6.81 ± 0.03b,c
MT7	47.2 ± 3.2a	46.9 ± 1.0a	0.946 ± 0.003d	6.61 ± 0.05c
MT8	31.3 ± 0.2d	38.9 ± 1.6b	0.964 ± 0.001c	6.72 ± 0.06b,c
MT9	30.9 ± 0.8d	32.7 ± 0.1c	0.968 ± 0.001b,c	6.82 ± 0.08a,b
GL1	36.9 ± 0.1c	35.8 ± 0.5c	0.961 ± 0.001c,d	6.83 ± 0.01a,b
GL2	24.6 ± 1.7f	20.6 ± 1.1e	0.967 ± 0.001c	6.62 ± 0.11c
GL3	32.9 ± 1.1c,d	32.0 ± 0.9c	0.966 ± 0.003c	6.69 ± 0.01b,c
GL4	42.2 ± 0.3b	32.1 ± 0.2c	0.966 ± 0.001c	6.58 ± 0.07d
GL5	35.1 ± 0.8c,d	39.5 ± 0.8b	0.963 ± 0.001c,d	6.83 ± 0.01a,b
GL6	31.0 ± 0.8d	29.2 ± 2.0d	0.966 ± 0.001c	6.75 ± 0.03b,c
GL7	32.0 ± 1.2c,d	23.7 ± 1.3d	0.986 ± 0.001a	6.81 ± 0.14b,c

Different letters in the same column indicate significant differences ( $p < 0.001$ ).

<sup>A</sup> ACH, chopped; MT mortadella; GL, galantines.

**Table 3**

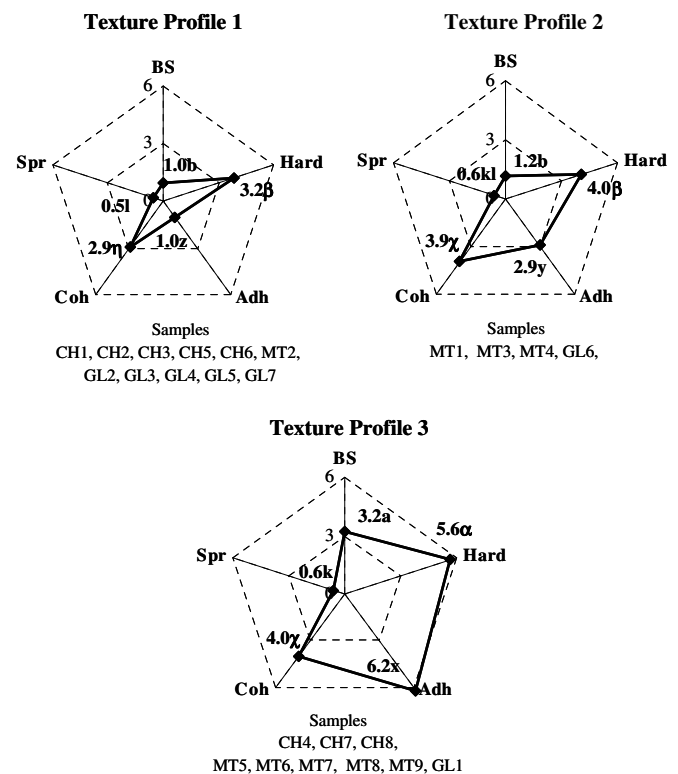
Textural properties of cooked meat sausages

Samples <sup>A</sup>	Breaking strength (N cm <sup>-2</sup> )	Energy to fracture (N mm)	Hardness (N)	Adhesiveness (N s)	Cohesiveness	Springiness 10 <sup>-2</sup> m	Foldingtest grade
CH1	0.24 ± 0.08d	2.17 ± 0.47c	61.2 ± 3.6c,d	-0.02 ± 0.02a	0.21 ± 0.06d	0.55 ± 0.06b,c	3
CH2	0.03 ± 0.01d	0.68 ± 0.08e	23.7 ± 1.7a	-0.17 ± 0.06b,c	0.26 ± 0.07c	0.47 ± 0.09c,d	3
CH3	1.70 ± 0.26b	5.14 ± 0.98b	50.8 ± 4.9d,e	-0.06 ± 0.01a	0.28 ± 0.04c	0.52 ± 0.07c	3
CH4	1.87 ± 0.38a,b	5.17 ± 1.54b	65.1 ± 6.3c	-0.53 ± 0.06d,e	0.34 ± 0.09b	0.54 ± 0.06b,c	5
CH5	2.17 ± 0.20a,b	6.22 ± 0.98a,b	44.0 ± 3.7e	-0.03 ± 0.02a	0.25 ± 0.03c	0.45 ± 0.05d	3
CH6	1.92 ± 0.36a,b	5.55 ± 1.54b	42.0 ± 5.6e	-0.04 ± 0.01a	0.27 ± 0.09c	0.54 ± 0.10b,c	3
CH7	3.50 ± 0.50a	18.35 ± 2.06a	70.1 ± 5.8b	-0.95 ± 0.10f	0.31 ± 0.07c	0.58 ± 0.07b	5
CH8	2.80 ± 0.18a,b	7.90 ± 1.12a,b	54.6 ± 2.4d	-1.08 ± 0.02f	0.32 ± 0.04b	0.61 ± 0.02a,b	5
MT1	1.64 ± 0.75b	4.36 ± 1.37b	41.9 ± 3.4e	-0.37 ± 0.08d,e	0.40 ± 0.06a,b	0.48 ± 0.03c	4
MT2	0.15 ± 0.02d	1.04 ± 0.23d	37.7 ± 5.2e,f	-0.24 ± 0.02b,c	0.18 ± 0.09d	0.46 ± 0.02c,d	3
MT3	0.96 ± 0.44c	2.28 ± 0.35c	40.6 ± 2.6e	-0.18 ± 0.03b,c	0.39 ± 0.07a,b	0.62 ± 0.05a,b	4
MT4	0.84 ± 0.27c	2.13 ± 0.32c	41.7 ± 2.6e	-0.20 ± 0.03b,c	0.40 ± 0.07a,b	0.62 ± 0.05a,b	4
MT5	4.25 ± 0.40a	16.09 ± 1.88a	55.3 ± 4.2d	-0.60 ± 0.03e	0.45 ± 0.03a	0.67 ± 0.06a	5
MT6	3.36 ± 0.46a	14.64 ± 1.81a	41.9 ± 2.9e	-0.40 ± 0.02d,e	0.50 ± 0.02a	0.67 ± 0.05a	5
MT7	3.59 ± 0.51a	11.44 ± 2.31a,b	78.2 ± 2.4a	-0.31 ± 0.09c,d	0.48 ± 0.04a	0.64 ± 0.04a,b	5
MT8	2.03 ± 0.22a,b	6.86 ± 2.19a,b	45.2 ± 3.5e	-0.24 ± 0.04b,c	0.45 ± 0.03a	0.53 ± 0.03c	5
MT9	2.73 ± 0.19a,b	10.05 ± 1.89a,b	40.6 ± 2.5e	-0.85 ± 0.03f	0.39 ± 0.08a,b	0.58 ± 0.03b	5
GL1	4.67 ± 0.24a	15.36 ± 1.31a	54.5 ± 3.6d	-0.60 ± 0.10e	0.40 ± 0.08a,b	0.62 ± 0.07a,b	5
GL2	1.65 ± 0.49b	4.25 ± 1.71b	32.5 ± 4.7f	-0.03 ± 0.01a	0.34 ± 0.05b	0.50 ± 0.07c	3
GL3	1.10 ± 0.27b	4.86 ± 1.25b	34.9 ± 2.0f	-0.03 ± 0.01a	0.28 ± 0.07c	0.46 ± 0.02d	3
GL4	0.57 ± 0.28c	2.24 ± 0.87c	20.9 ± 1.9a	-0.24 ± 0.10b,c	0.27 ± 0.03c	0.48 ± 0.05c,d	3
GL5	0.96 ± 0.18c	1.88 ± 0.27c	21.0 ± 2.1a	-0.13 ± 0.06a,b	0.37 ± 0.09b	0.64 ± 0.06a,b	3
GL6	1.24 ± 0.47b	4.30 ± 1.08b	37.4 ± 2.2e,f	-0.59 ± 0.08e	0.34 ± 0.09b	0.61 ± 0.06a,b	4
GL7	0.08 ± 0.03d	0.72 ± 0.35e	50.8 ± 7.2d,e	-0.10 ± 0.03a,b	0.46 ± 0.04a	0.68 ± 0.03a	3

Different letters in the same column indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).<sup>A</sup> CH, chopped; MT mortadella; GL, galantines.

and 0.68 and 18.35 N mm, respectively. The most representative values of BS and EF were those in the range of 1–3 N/cm<sup>2</sup> and 4–12 N mm, respectively. About 50% of cooked meat sausages showed BS and EF values within these intervals. The galantines had low-values of BS and EF, except for the GL1 sample. Hardness ranged from 20.9 to 78.2 N, with around 63% of the samples showing values lower than 50 N (Table 3). As in the case of BS and EF, the galantines had low hardness, except for the GL1 sample. Values for adhesiveness values ranged from -0.02 to -1.08 N mm, indicating a great variation in this textural property amongst all samples studied. The cohesiveness ranged from 0.21 to 0.34, from 0.18 to 0.50 and from 0.27 to 0.46 for chopped, mortadella and galantines, respectively. Springiness values showed less variation with 88% of samples ranging from 0.45 to 0.65 10<sup>-2</sup> m. The range of TPA values shown in Table 3 are similar to that reported by some authors for different cooked sausages (García et al., 2006; Kerr et al., 2005; Mor-Mur & Yuste, 2003; Yılmaz et al., 2002). According to the folding test (Table 3) samples were assigned to grades 3, 4 and 5. Only 33% of the products did not crack when folded into quadrants and fell into the maximum grade (5). However, 62.5% of chopped and about 71% of the galantines scored grade 3 (crack develops gradually when folded in half), while only 11% of the mortadella scored this grade. The majority of the mortadella, 55.5%, was in grade 5.

Pearson product moment correlations among the texture variables shown in Table 3 were performed. Results indicated that BS, hardness, cohesiveness and adhesiveness were strongly correlated ( $p < 0.0001$ ). After applying an analysis of principal components using the data obtained for these textural properties of cooked sausages as criterion of association, it was possible to distinguish three different clusters. The mean values of BS, hardness, cohesiveness and adhesiveness of the different sausages included in each cluster and the mean values of springiness were calculated and then plotted. As it can be observed in Fig. 1, three different ( $p < 0.05$ ) textural profiles, arbitrary named 1, 2, and 3, were obtained. These textural profiles showed significant ( $p < 0.05$ ) differences for textural properties, mainly for BS, hardness, adhesiveness and cohesiveness (Fig. 1). The main textural differences ( $p < 0.05$ )



**Fig. 1.** Textural profiles (1, 2 and 3) and mean values of different textural parameters from cooked meat sausages (CH, chopped; MT, mortadella; GL, galantines). BS: Breaking strength (N cm<sup>-2</sup>), Hard: Hardness (10<sup>-1</sup> N), Adh: Adhesiveness (-10 N s), Coh: Cohesiveness (×10), Spr: Springiness (10<sup>-2</sup> m). Mean values with different letter differ significantly ( $p < 0.05$ ): a, b for BS; α, β for Hard; x, y, z for Adh; χ, η for Coh; k, l for Spr.

were observed between the textural profiles 1 and 3. Textural profile 1 showed lower values ( $p < 0.05$ ) of BS, hardness, adhesiveness, cohesiveness and springiness than textural profile 3. Profile 2



showed intermediate textural behaviour between profiles 1 and 3 with similar ( $p > 0.05$ ) values of BS and hardness to textural profile 1, and similar values ( $p > 0.05$ ) of cohesiveness and springiness to profile 3, and intermediate values of adhesiveness (Fig. 1).

About 46% of cooked meat sausages were included in textural profile 1 and only a 17% of the samples analysed were grouped in the textural profile 2 (Fig. 1). It could be observed that mortadella and galantine samples were very heterogeneous products because they are included in the three textural profiles although the majority of mortadella (67%) belonged to profile 3 and 71% of galantines were included in profile 1 (Fig. 1). Chopped was a more homogeneous product with samples belonging to textural profiles 1 (62.5%) and 3 (Fig. 1).

The folding test results showed that samples included in textural profile 1 scored grade 3 (crack develops gradually when folded in half). These results could be associated with low-values of BS and TPA parameters of the textural profile 1. All products belonging to profile 1 (Fig. 1) were visually characterized (Table 1) by a matrix of a fine emulsion that included large meat pieces and other materials. Samples classified in the textural profile 3 (Fig. 1) scored grade 5 (Table 3) in the folding test (no crack when folded into quadrants), which is the maximum grade, indicating good gelling ability. These scores in the folding test could be explained by the high values of breaking strength and TPA parameters of the textural profile 3. The visual and rheological analysis of profile 3 products indicated that its textural behaviour could be associated with a strong matrix of fine emulsion with or without coarse meat (Table 1). Folding test results indicated that samples of textural profile 2 scored grade 4, no crack when folded in half. These textural profiles had intermediate values for BS and TPA parameters. The visual (Table 1) and the rheological analysis (Table 3, Fig. 1) could indicate that texture behav-

iour of samples of profile 2 are associated with a well gelled matrix which included materials of different origin and size (kamaboko, olives, etc.) or fat cubes which are easily liberated during the folding test.

### 3.3. Linear regression analysis

The multiple linear regression analyses (Table 4), using the different textural parameters as dependent variables and values of dry matter, fat contents and  $a_w$  as independent variables, revealed a significant relation between hardness ( $R^2 = 0.308$ ,  $p < 0.05$ ), cohesiveness ( $R^2 = 0.440$ ,  $p < 0.0005$ ), breaking strength ( $R^2 = 0.330$ ,  $p < 0.005$ ), energy to fracture ( $R^2 = 0.234$ ,  $p < 0.05$ ) and folding test grade ( $R^2 = 0.334$ ,  $p < 0.05$ ), versus DM, fat content and  $a_w$  (Table 4). The statistical significance of the  $t$ -values indicates that DM and fat content participate in all textural parameters previously mentioned. These results are in agreement with some authors who have described the relationship between fat content and textural properties of cooked meat sausages (Giese, 1996; Jiménez-Colmenero, 2000; Rust & Olson 1988). Results of the  $t$ -values showed a significant correlation between  $a_w$  and cohesiveness, BS and EF. In previous work (Herrero et al., 2007) it was found that in dry fermented sausages,  $a_w$  is highly correlated with breaking strength, while dry matter is correlated with cohesiveness, springiness and adhesiveness.

Simple linear regression analysis was performed to determine the degree of association between BS and EF versus folding test grade (FG). Significant ( $p < 0.0001$ ) coefficients of determination between tensile and folding test parameters were obtained ( $R^2 = 0.586$  for BS versus FG and  $R^2 = 0.564$  for EF versus FG). The equations of the fitted models were BS =  $-2.533 + 1.120 \cdot FG$  (correlation coefficient,  $R = 0.765$ ,  $R^2$  adjusted for degrees of

**Table 4**

Multiple linear regression analysis of textural parameters versus dry matter (DM, % wet matter), fat content (% DM) and water activity ( $a_w$ ) of cooked meat sausages

Dependent variable	$R^2$	SE	Independent variable	Regression coefficient	$t$ -Values	$\beta$ -Values
Hardness	0.308*	8.917	Constant	22.496		
			DM	-0.929	-2.762*	-0.432
			Fat content	0.766	3.148**	0.518
			$a_w$	21.717	-1.026	0.012
Cohesiveness	0.440***	0.069	Constant	7.396		
			DM	-0.012	-4.184***	-0.637
			Fat content	0.007	3.896***	0.561
			$a_w$	-7.119	-3.639**	-0.547
Adhesiveness	0.080	0.382	Constant	3.281		
			DM	0.001	0.054	0.009
			Fat content	-0.014	-1.080	-0.225
			$a_w$	-3.305	-0.268	-0.057
Springiness	0.115	0.001	Constant	0.025		
			DM	$5.011 \times 10^{-5}$	-0.942	0.020
			Fat content	$6.554 \times 10^{-5}$	1.954	0.039
			$a_w$	-0.020	-0.587	-0.114
Breaking strength	0.330**	1.443	Constant	106.383		
			DM	-0.119	-2.163*	-0.330
			Fat content	0.097	2.785*	0.422
			$a_w$	-107.14	-2.977**	0.438
Energy to fracture	0.234*	5.019	Constant	303.271		
			DM	-0.467	-2.332*	-0.362
			Fat content	0.348	2.733*	0.414
			$a_w$	-302.775	-2.222*	-0.350
Folding test grade	0.334*	0.81	Constant	44.16		
			DM	-0.075	-1.943*	-0.003
			Fat content	0.06	2.491*	0.002
			$a_w$	-41.28	-1.67	-0.152

$n = 72$ ; SE = standard error;  $R^2$  = coefficient of determination (correlation coefficient square).

\*  $p < 0.05$ .

\*\*  $p < 0.005$ .

\*\*\*  $p < 0.0005$ .

freedom = 0.567, mean absolute error = 0.751) and EF =  $-10.182 + 4.235 \cdot \text{FG}$  ( $R = 0.751$ ,  $R^2$  adjusted for degrees of freedom = 0.545, mean absolute error = 2.85). Table 5 shows the multiple linear regression analysis of the BS and EF versus TPA parameters (cohesiveness, adhesiveness, hardness and springiness) for each cooked meat sausage type (chopped, mortadella or galantines) and for all samples. In the chopped samples, a significant multiple linear regression model ( $R^2 = 0.733$ ,  $p < 0.00005$ ) was found between breaking strength and TPA parameters, while energy to fracture was not significantly correlated ( $p > 0.05$ ) with parameters obtained by TPA analysis (Table 5). Student's  $t$ -values of cohesiveness, adhesiveness, hardness and springiness partial regression coefficients were significant [BS versus cohesiveness ( $p < 0.0005$ ), BS versus adhesiveness ( $p < 0.0005$ ), BS versus hardness ( $p < 0.00005$ ) and BS versus springiness ( $p < 0.00005$ )]. However,  $\beta$  values suggest

that cohesiveness, hardness and springiness values have direct influence on the BS determination.

A highly significant multiple linear regression was found between breaking strength ( $R^2 = 0.864$ ,  $p < 0.00005$ ) and energy to fracture ( $R^2 = 0.809$ ,  $p < 0.00005$ ) and TPA parameters in mortadella samples (Table 5). In these meat products, Student's  $t$ -values of cohesiveness ( $p < 0.005$ ), adhesiveness ( $p < 0.005$ ) and hardness ( $p < 0.00005$ ) partial regression coefficients were significant versus BS, while all TPA parameters [(cohesiveness ( $p < 0.0005$ ), adhesiveness ( $p < 0.00005$ ), hardness ( $p < 0.05$ ), and springiness ( $p < 0.05$ )] partial regression coefficients were significant versus EF. In addition,  $\beta$  values suggest that hardness and adhesiveness are the most important TPA parameters in BS and EF determination, respectively.

In the galantine samples, it was possible to find a high significant multiple linear regression ( $R^2 = 0.937$ ,  $p < 0.05$ ) between

**Table 5**

Multiple linear regression analysis of tension mechanical parameters (breaking strength and energy to fracture) versus texture profile analysis (TPA) parameters of cooked meat sausages

Dependent variable	$R^2$	SE	Independent variable	Regression coefficient	$t$ -Values	$\beta$ - Values
<i>Chopped</i>						
Breaking strength	0.733 <sup>****</sup>	0.651	Constant	−0.148		
			Cohesiveness	6.455	4.065 <sup>***</sup>	0.694
			Adhesiveness	−3.285	−3.360 <sup>***</sup>	−0.706
			Hardness	0.048	5.735 <sup>****</sup>	0.866
			Springiness	−506.07	−5.196 <sup>****</sup>	0.999
Energy to fracture	0.573	4.796	Constant	−9.109		
			Cohesiveness	6.307	0.407	0.092
			Adhesiveness	−2.681	−0.584	−0.205
			Hardness	0.258	1.710 <sup>***</sup>	0.464
			Springiness	44.884	0.058	0.030
<i>Mortadella</i>						
Breaking strength	0.864 <sup>****</sup>	0.535	Constant	−3.817		
			Cohesiveness	6.359	3.003 <sup>**</sup>	0.503
			Adhesiveness	−2.890	−3.798 <sup>**</sup>	0.574
			Hardness	0.061	6.510 <sup>****</sup>	0.999
			Springiness	−97.42	0.498	−0.147
Energy to fracture	0.809 <sup>****</sup>	2.638	Constant	−24.028		
			Cohesiveness	33.289	3.914 <sup>***</sup>	0.898
			Adhesiveness	−19.206	−5.066 <sup>****</sup>	0.998
			Hardness	0.106	2.135 <sup>*</sup>	0.440
			Springiness	1038.82	1.937 <sup>*</sup>	0.590
<i>Galantines</i>						
Breaking strength	0.937 <sup>*</sup>	0.206	Constant	2.930		
			Cohesiveness	−3.068	−1.708	−0.650
			Adhesiveness	−1.218	−3.879 <sup>**</sup>	−0.889
			Hardness	−0.012	−1.434	−0.583
			Springiness	−86.20	−0.969	−0.436
Energy to fracture	0.509	2.973	Constant	10.395		
			Cohesiveness	−11.530	−0.451	−0.198
			Adhesiveness	1.097	0.251	0.111
			Hardness	0.036	0.333	0.148
			Springiness	−562.72	−0.507	−0.222
<i>Combination of all cooked meat sausages</i>						
Breaking strength	0.745 <sup>****</sup>	0.643	Constant	−0.160		
			Cohesiveness	6.600	4.462 <sup>***</sup>	0.633
			Adhesiveness	−1.255	−3.670 <sup>***</sup>	−0.509
			Hardness	0.048	6.118 <sup>****</sup>	0.834
			Springiness	−506.31	−5.271 <sup>****</sup>	−0.778
Energy to fracture	0.491 <sup>****</sup>	3.921	Constant	−4.487		
			Cohesiveness	−11.530	1.797 <sup>*</sup>	0.264
			Adhesiveness	1.097	−2.443 <sup>*</sup>	−0.355
			Hardness	0.036	3.861 <sup>***</sup>	0.531
			Springiness	−562.72	−1.680	−0.251

SE = standard error;  $R^2$  = Coefficient of determination (Correlation coefficient square).

\*  $p < 0.05$ .

\*\*  $p < 0.005$ .

\*\*\*  $p < 0.0005$ .

\*\*\*\*  $p < 0.00005$ .

breaking strength and TPA parameters, although only Student's *t*-value of adhesiveness partial regression coefficient was significant versus BS. Energy to fracture was not significant correlated ( $p > 0.05$ ) with TPA parameters (Table 5) for galantines.

For all cooked meat sausages, a highly significant multiple linear regression was found between breaking strength ( $R^2 = 0.745$ ,  $p < 0.00005$ ) and TPA parameters (Table 5). The Student's *t*-values of cohesiveness, adhesiveness, hardness and springiness partial coefficients were significant [BS versus cohesiveness ( $p < 0.0005$ ), BS versus adhesiveness ( $p < 0.0005$ ), BS versus hardness ( $p < 0.00005$ ), BS versus springiness ( $p < 0.00005$ )]. In addition,  $\beta$  values suggest that hardness plays the most important role in breaking strength determination. Also, a significant regression was found between energy to fracture ( $R^2 = 0.491$ ,  $p < 0.00005$ ) and TPA parameters (Table 5) but only Student's *t*-values of adhesiveness and hardness partial coefficients were significant [EF versus adhesiveness ( $p < 0.05$ ) and EF versus hardness ( $p < 0.0005$ )].

Therefore, the best regression model to predict tensile properties for cooked meat sausages is using BS as the dependent variable and TPA parameters as independent variables. The resulting regression model is  $BS = -0.160 + 6.600 \times \text{cohesiveness} - 1.255 \times \text{adhesiveness} + 0.048 \times \text{hardness} - 506.31 \times \text{springiness}$ . The correlation coefficient *R* was 0.863, the  $R^2$  adjusted for degrees of freedom 0.715, and the mean absolute error was 0.511. Results of the multivariate analysis confirm that TPA parameters chosen were relevant for constructing regression models to predict BS for cooked meat sausages. Therefore with only a TPA analysis it could be possible to obtain both the TPA and tensile parameters such as the breaking strength.

#### 4. Conclusions

The determination of breaking strength (BS) and the energy to fracture (EF) by tensile test can be used together with the TPA, to determine textural properties of cooked meat sausages. With these analyses complementary information is obtained, which permits grouping of cooked meat sausages into three different textural profiles. These textural profiles are characterized by the values BS, hardness, adhesiveness and cohesiveness.

The multivariate analysis confirms that TPA parameters (cohesiveness, adhesiveness, hardness and springiness) could be used to construct regression models to predict breaking strength. Therefore, with only a TPA analysis it could be possible to obtain both the TPA and tensile parameters such as the breaking strength.

#### Acknowledgements

This work was funded by the (Project AGL04-6773). A.M. Herrero was supported by a contract from the Juan de la Cierva Program and M.D. Romero de Avila was awarded a grant, from the Ministerio de Educación y Ciencia. Authors are also grateful to the Universidad Complutense and Comunidad de Madrid for their financial support to the research group "920276-Tecnología de Alimentos de Origen Animal".

#### References

- Bourne, M. C. (1978). Texture profile analysis. *Food Technology*, 32, 62–66.
- Bourne, M.C. (2002). Principles of objective texture measurement. In M. C. Bourne (Ed.), *Food texture and viscosity: Concept and measurement* (pp. 107–188). San Diego, USA.
- Christensen, M., Purslow, P. P., & Larsen, L. M. (2000). The effect of cooking temperature on mechanical properties of whole meat, single muscle fibres and perimysial connective tissue. *Meat Science*, 55, 301–307.
- Christensen, M., Young, R. D., Lawson, M. A., Larsen, L. M., & Purslow, P. P. (2003). Effect of added ( $\mu$ -calpain and post-mortem storage on the mechanical properties of bovine single muscle fibres extended to fracture. *Meat Science*, 66, 105–112.
- Desmond, E. (2006). Reducing salt: A challenge for the meat industry. *Meat Science*, 74, 188–196.
- Farouk, M. M., Hall, W. K., Harrison, M., & Swan, J. E. (1999). Instrumental and sensory measurement of beef patty and sausage texture. *Journal of Muscle Foods*, 10, 17–28.
- Farouk, M. M., Zhang, S. X., & Waller, J. (2005). Meat spaghetti tensile strength and extensibility as indicators of the manufacturing quality of thawed beef. *Journal of Food Quality*, 28, 452–466.
- García, M. L., Cáceres, E., & Selgas, M. D. (2006). Effect of inulin on the textural and sensory properties of mortadella, a Spanish cooked meat product. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 1207–1215.
- Giese, J. (1996). Fats, oils and fat replacers. *Food Technology*, 50, 78–83.
- Hanson, S. W. F., & Olley, J. (1963). Application of the Bligh and Dyer method of lipid extraction to tissue homogenates. *Biochemical Journal*, 89, 101–120.
- Herrero, A. M., Ordóñez, J. A., Romero de Ávila, M. D., Herranz, B., de la Hoz, L., & Cambero, M. I. (2007). Breaking strength of dry fermented sausages and their correlation with Texture Profile Analysis (TPA) and physico-chemical characteristics. *Meat Science*, 77, 331–338.
- Honikel, K. O. (1998). Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat Science*, 49, 447–457.
- Jiménez-Colmenero, F. (2000). Relevant factors in strategies for fat reduction in meat products. *Trends in Food Science and Technology*, 11, 56–66.
- Kemi, V. E., Karkkainen, M. U., & Lamberg-Allardt, C. J. E. (2006). High phosphorus intakes acutely and negatively affect  $\text{Ca}^{2+}$  and bone metabolism in a dose-dependent manner in healthy young females. *British Journal of Nutrition*, 96, 545–552.
- Kerr, W. L., Wang, X., & Choi, S. G. (2005). Physical and sensory characteristics of low-fat Italian sausage prepared with hydrated oat. *Journal of Food Quality*, 28, 62–77.
- Kilcast, D. (2004). Force/deformation techniques for measuring texture. In D. Kilcast (Ed.), *Texture in food* (Vol. 2, pp. 109–145). Abington, Cambridge UK: Woodhead Publishing Ltd.
- Lepetit, J., & Culoli, J. (1994). Mechanical properties of meat. *Meat Science*, 36, 203–237.
- Lewis, G. J., & Purslow, P. P. (1989). The strength and stiffness of perimysial connective tissue isolated from cooked beef muscle. *Meat Science*, 26, 255–269.
- Mielnik, M. B., Aaby, K., Rolfsen, K., Ellekjær, M. R., & Nilsson, A. (2002). Quality of comminuted sausages formulated from mechanically deboned poultry meat. *Meat Science*, 61, 73–84.
- Mor-Mur, M., & Yuste, J. (2003). High pressure processing applied to cooked sausage manufacture: Physical properties and sensory analysis. *Meat Science*, 65, 1187–1191.
- Mutungi, G., Purslow, P., & Warkup, C. (1995). Structural and mechanical changes in raw and cooked single porcine muscle fibres extended to fracture. *Meat Science*, 40, 217–234.
- Rust, R., & Olson, D. (1988). Making good "lite" sausage. *Meat and Poultry*, 34, 10–16.
- Ruusunen, M., & Puolanne, E. (2005). Reducing sodium intake from meat products. *Meat Science*, 70, 531–541.
- Scott-Blair, G. W. (1958). Rheology in food research. *Advances in Food Research*, 8, 1–61.
- Suzuki, T. (1981). Kamaboko (fish cake). In *Fish and krill protein. Processing technology* (pp. 62–191). London: Applied Science Publishers Ltd.
- Willems, M. E. T., & Purslow, P. P. (1996). Effect of postrigor sarcomere length on mechanical and structural characteristics of raw and heat-denatured single porcine muscle fibres. *Journal of Texture Studies*, 27, 217–233.
- Yılmaz, I., Simsek, O., & Isikli, M. (2002). Fatty acid composition and quality characteristics of low-fat cooked sausages made with beef and chicken meat, tomato juice and sunflower oil. *Meat Science*, 62, 253–258.





### **ARTÍCULO 1.3.**

**Tensile test and Texture Profile Analysis (TPA) to  
monitoring rheological properties of commercial cooked  
meat products**

**Meat Science. (2013). En revisión.**



Ms. Ref. No.: MEATSCI-D-13-00332

Title: Tensile test and Texture Profile Analysis (TPA) to monitoring rheological behaviour of commercial cooked meat products

Meat Science

Dear Isabel,

Your submission entitled "Tensile test and Texture Profile Analysis (TPA) to monitoring rheological behaviour of commercial cooked meat products" will be handled by Associate Editor David Hopkins, B. Agr.Sc., M. Agr. Sc., PhD.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/meatsci/>.

Your username is: [icambero@vet.ucm.es](mailto:icambero@vet.ucm.es)

If you need to retrieve password details, please go to:

[http://ees.elsevier.com/meatsci/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/meatsci/automail_query.asp)

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System

Meat Science

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.



# Tensile test and Texture Profile Analysis (TPA) to monitoring rheological behaviour of commercial cooked meat products

M. Dolores Romero de Ávila<sup>a</sup>, M. Isabel Cambero<sup>a\*</sup>, Juan A. Ordóñez<sup>a</sup>, Lorenzo de la Hoz<sup>a</sup>, Ana M. Herrero<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Dpto. Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid. Spain

<sup>b</sup>Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC). 28040 Madrid. Spain

## ABSTRACT

The breaking strength (BS) and energy to fracture (EF) of commercial cooked meat products (CMP) manufactured from different entire pieces were determined by tensile test (TT). Values were related to those texture profile analysis (TPA) parameters and physico-chemical measurements, in order to provide a complete characterization of CMP. Principal component analysis enabled the CMP to be grouped into two different textural profiles. These textural profiles are characterized mainly by the values of BS, springiness and adhesiveness. The CMP included in each textural profile also showed different physico-chemical characteristics. The multivariate analysis confirms that TPA parameters (cohesiveness, adhesiveness, hardness and springiness) could be used to construct regression models to predict BS and EF. Therefore, with only a TPA analysis it could be possible to obtain both the TPA and tensile parameters. The resulting regression model for BS was:  $BS = 1.244 - 0.038 \times \text{Hardness} - 1.279 \times \text{Adhesiveness} - 4.892 \times \text{Cohesiveness} + 7.321 \times \text{Springiness}$  ( $R^2 = 0.690$ ,  $p < 0.00005$ ).

**Keywords:** cooked meat, tensile test, texture profile analysis, breaking strength, energy to fracture.

**Running title:** Rheological properties of cooked meat products

## 1. Introduction

The pronounced transformation of dietary habits has led to the manufacture of a vast variety of ready-to-eat (RTE) foods of animal origin. Many of these alternatives involve cooked meat products (such as pork ham, breast and ham both from turkey and chicken, etc.) which are prepared in small portions (slices, steaks, small pieces, reformed cold cut, etc.). These slices which could be break easily during handling, processing and packing. The RTE cooked meat products market is developing at a rapid rate and, in many countries, has become the main way of these products distribution.

The consumer interest in the development of meat cooked sausage applying new technologies and formulations, using different types of meat (pork, beef, poultry) and reducing levels of phosphate, salt and fat which report beneficial effects on health are growing in the last years (Jiménez-Colmenero, 2000; Desmond, 2006; Kemi, Kärkkäinen, & Lamberg-Allardt, 2006). Manufacturing modifications may affect quality of these products, particularly, textural attributes (Ruusunen & Puolanne, 2005; Herrero, de la Hoz, Ordóñez, Herranz, Romero de Ávila, & Cambero, 2008).

The rheological behavior, including the textural feature, may be studied by several mechanical methods. The tensile test is based on resistance of the sample to tension force deformation. These methods have the advantage of simplicity and the results obtained can be correlated with texture sensory analysis. Several tensile parameters could be obtained such as the maximum rupture force (maximum peak height resisted by the material), breaking strength (maximum rupture force by the cross-sectional area of the product) and energy to fracture (area under the deformation curve) (Honikel, 1998; Bourne 2002). The tensile test has been used to study the mechanical properties of whole meat, single muscle fibres and perimysial connective tissue (Lewis & Purslow, 1989; Lepetit & Culioli, 1994; Mutungi, Purslow, & Warkup, 1995; Willems & Purslow 1996; Christensen, Purslow, & Larsen, 2000; Christensen, Young, Lawson, Larsen, & Purslow, 2003). In previously words, it has been used successfully tensile test in dry fermented and cooked meat sausages (chopped, galantines and mortadellas) to obtain more textural properties information about these products and to measure their breaking strength (Herrero, Ordóñez, Romero de Ávila, Herranz, de la Hoz, & Cambero, 2007; Herrero et al., 2008). This tensile property is an important parameter of quality in sausages when it is

\* Author to whom the correspondence should be addressed: M. I. Cambero, Departamento Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense. 28040 Madrid. Spain. Phone: +34 913943745; Fax: +34 913943743 E-mail address: [icambero@vet.ucm.es](mailto:icambero@vet.ucm.es) (M.I.Camero)

commercialized in sliced. For example, if the breaking strength is less than the superficial adhesion force between the product and the surface line of the processing equipment an important inconvenient could arise because many of products could break leading to problems that can result in the processed line being stopped. Another undesirable example is when the force of adhesion of the product to packaging material or to other slice of the product is higher than breaking strength because this result in distortion, disfigurement and break of the product which produces adverse reactions of the consumers. These problems could be presented in meat cooked products such as cooked ham when they are sliced and vacuum packaged.

Therefore, the primary aim of this work was to apply tensile tests to cooked meat products manufactured from different entire piece (such as ham and shoulder from pork and breast and thigh from poultry) to determine their tensile parameters (breaking strength and energy to fracture) and relating these results with those of TPA parameters and physico-chemical characteristics, in order to provide a complete characterization of these cooked meat products. Once the relationship between tensile and TPA parameters is established, multiple linear

regression could be used to predict the tensile parameters using the TPA results as predictor variables. Thus, with a simple test (TPA) it should be possible to obtain data of tensile and compression textural parameters for cooked ham.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Description of the samples

Several commercial brands (between 5 and 7) of fourteen types of different cooked meat products manufactured from different entire piece (Table 1) were purchased in Spain in retail shops. The common ingredients in this type of product are lean pork (cooked pork products), turkey and chicken meats (cooked poultry products), water, nitrites and/or nitrates, spices, starch, modified starch, thickeners and sugars. Table 1 summarizes the information about the meat origin (pork or poultry) of each sample. The samples were analysed before 48 hours of storage at  $4 \pm 1$  °C. All the sausages were subjected to each type of physico-chemical and textural analysis.

Table1. Characteristics, dry matter (DM) (g/100 g of product), fat content (g/100 g of DM), water activity ( $a_w$ ) and pH of cooked meat products

Cooked meat product characteristics		Symbol	DM	Fat content	$a_w$	pH
Cooked pork products	<b>Extra quality cooked ham</b> (water/protein < 4.13)	H1	30.0±1.8a	17.6±2.3b	0.988±0.005a	6.14±0.08c,d
	<b>Cooked ham lean</b> (< 3 g fat /100 g product )	H2	24.7±1.1b	5.6±1.2c	0.974±0.005b	6.49±0.06b
	<b>Cooked ham</b> [without salt (0.1% sodium) and starch addition]	H3	26.0±2.0a,b	16.3±2.3b	0.999±0.005a	6.27±0.10c
	<b>Extra quality cooked ham</b> [water/protein < 4.13 and without added phosphates]	H4	27.5±1.9a	15.7±2.7b	0.967±0.005b	6.09±0.03d
	<b>Cooked shoulder picnic</b>	S	29.1±1.1a	6.6±1.5c	0.974±0.009a,b	6.75±0.04a
	<b>Cooked ham</b> (Reformed cold cut)	PR	22.5±1.2b	5.3±1.2c	0.976±0.009a,b	6.57±0.05b
	<b>Cooked and smoked ham</b> (Lacon type, whole leg, with bone and skin)	H5	23.3±1.7b	30.4±3.0a	0.974±0.009a,b	6.25±0.06c
Cooked poultry products	<b>Roasted deboned ham</b>	H6	28.1±2.1a	7.9±2.5b	0.971±0.005b	6.61±0.06b
	<b>Turkey breast</b> (in natural juice)	TB1	26.1±1.8a,b	10.1±1.2b	0.977±0.006a,b	6.24±0.03c
	<b>Turkey breast</b> (labeled as lean and low in fat)	TB2	26.2±1.8a,b	5.2±1.4c	0.971±0.003b	6.51±0.02b
	<b>Turkey breast</b>	TB3	21.2±2.8b	4.9±2.2c	0.970±0.005b	6.50±0.05b
	<b>Turkey breast</b> (Reformat turkey cold cut)	TR	26.4±2.2a,b	6.7±1.8c	0.975±0.005a,b	6.63±0.05b
	<b>Turkey ham</b> (thigh meat)	TH	21.3±1.3b	10.3±1.9b	0.974±0.004a,b	6.36±0.03c
	<b>Chicken breast</b>	CB	25.2±1.5b	6.7±1.9c	0.973±0.008a,b	6.52±0.03b

Data are the mean ± standard deviation

a,b,c,d: Different letters in the same column indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

## 2.2. Physico-chemical analysis

After removing the plastic case, chemical analyses were made in duplicate in all cooked meat products. About 200 g of sample were finely cut and some aliquots were used for the different analysis. The pH was determined in a distilled water homogenate (1:10) (w/v) of the sample (10 g) using a Crison Digit-501 pH meter (Crison Instruments LTD, Barcelona, Spain). Dry matter (DM) was determined by drying the sample at 110 °C to constant weight and the results were expressed as a percentage. Water activity ( $a_w$ ) was measured using a Decagon CX1 hygrometer (Decagon Devices Inc., Pullman, WA, USA) at 25 °C. The total fat content of the samples was determined by cold extraction in chloroform and methanol in the presence of antioxidant BHT as described by Hanson & Olley (1963) and was quantified gravimetrically. Results were expressed as percentage of dry matter (DM).

## 2.3. Rheological Analysis

Texture profile analysis (TPA) and tensile test were carried out at about 22 °C. All textural procedures involved discarding the external plastic case of the cooked meat products.

TPA and tensile test were performed using a TAX.T2i SMS Stable Micro Systems Texture Analyser (Stable Microsystems Ltd., Surrey, England) with the *Texture Expert* programmes.

**Texture Profile Analysis (TPA).** In general, four cylinders of 1.5 cm height and 2 cm wide were prepared from every sample. A double compression cycle test was performed up to 50% compression of the original portion height with an aluminium cylinder probe of 2 cm diameter. A time of 5 seconds was allowed to elapse between the two compression cycles. Force-time deformation curves were obtained with a 25 kg load cell applied at a cross-head speed of 2 mm/s. The following parameters were quantified (Bourne, 1978): hardness (N) maximum force required to compress the sample, springiness (m), ability of the sample to recover its original form after deforming force was removed, adhesiveness (N x s), area under the abscissa after the first compression, and cohesiveness, extent to which the sample could be deformed prior to rupture.

**Tensile test.** In general, five pieces were cut in a dumbbell shape with approximately 7.5 cm long, 2 cm wide in the narrowest zone and 0.2 cm thickness per sample. A load cell of 5 kg was employed. For analysis, one tensile grip (A/TGT) was fixed to the base of the textural analyser, while the other one was attached to the load cell. Initial grip separation was

12.5 mm and crosshead speed was 1.0 mm/s until rupture (Herrero et al., 2007). Each sample was placed between both tensile grips on the textural analyzer. Rupture force was taken as the maximum force peak height (N) required for breaking the sample. Breaking strength (N/cm<sup>2</sup>) was obtained dividing the rupture force by the cross-sectional area (thickness x width) of the portions. Energy to fracture (N x mm) was calculated as the area under the deformation curve (Honikel, 1998).

## 2.4. Statistical analysis

An individual cooked meat product was the experimental unit for analysis of all data. To check the normal distribution (90% confidence) of samples, the Shapiro-Wilks test was applied. When samples fitted the normal distribution, one-way ANOVA analysis was performed. When samples did not fit the normal distribution, the Kruskal-Wallis test was used to test the null hypothesis that the medians of variable within each of the levels of samples were the same. Duncan's test to multiple mean comparisons (at 95% or 99% of confidence level), Pearson product moment correlations, principal component and multiple regression analysis (using a Durbin-Watson statistic tests, at 95% of confidence level) were performed to determine the relationships between data obtained by tensile test, TPA and physico-chemical analysis. The statistical analysis was carried out using a Statgraphics Plus version 5.0. The analyses were conducted across all cooked meat product types. Data were presented as the means of each batch and the standard deviation (SD) of the mean.

# 3. Results and discussion

## 3.1. Physico-chemical analysis

Significant differences ( $p < 0.05$ ) for the data of dry matter (DM), fat content (% DM), water activity ( $a_w$ ) and pH of the different cooked meat products analysed were found (Table 1). The dry matter and fat content of the commercial cooked meat products ranged from 21 to 30%. These results are in value interval of dry matter reported by several authors (Desmond & Kemi, 2005; Cheng, Sun & Scannell, 2005; Vermeiren, Devlieghere, Vandekinderen, Rajtak, & Debevere, 2006; Válková et al., 2007) and fat content (Desmond et al., 2000; Santos et al., 2004) of cooked hams. The average fat content values as a function of meat origin showed that poultry products showed lower fat ( $p < 0.005$ ) content than pork cooked ham.



The  $a_w$  and pH values of the commercial cooked meat products (Table 1) ranged from 0.967 to 0.988, and 6.09 to 6.75, respectively. The pH values are according to literature values for similar cooked meat products (Vermeiren et al, 2006).

### 3.2. Rheological properties

Rheological properties of cooked ham are shown in Table 2. Significant differences ( $p < 0.05$ ) and tensile

test and TPA parameters were found between the cooked meat products analysed (Table 2). The breaking strength (BS) ranged between 0.1 to 3.5 N/cm<sup>2</sup>, with around 57% of the analysed products showing values higher than 2 N/cm<sup>2</sup>. Energy to fracture (EF) ranged from 1.1 to 19.3 Ns. Around 64% of cooked meat products presented EF values higher than 2 Ns.

Table 2. Rheological properties of cooked meat products

Sample (*)	Breaking strength (N/cm <sup>2</sup> )	Energy to fracture (Ns)	Hardness (N)	Adhesiveness (Ns)	Cohesiveness	Springiness 10 <sup>-2</sup> (m)
H1	0.12±0.02f	1.11±0.12f	71.8±4.4a	-0.26±0.05b	0.38±0.11a,b	0.56±0.13a
H2	3.52±0.22a	19.33±3.83a	66.8±2.9a,b	-0.07±0.01d	0.40±0.06a,b	0.65±0.07a
H3	0.16±0.04f	1.21±0.17e,f	65.8±3.3a,b	-0.07±0.01d	0.44±0.06a	0.52±0.07a
H4	0.57±0.18e	1.90±0.66d,e	66.5±3.6a,b	-0.20±0.09b,c	0.42±0.03a,b	0.52±0.07a
S	2.07±0.32c,d	5.84±1.26c	54.1±2.9c,d	-0.12±0.04c	0.43±0.07a,b	0.62±0.05a
PR	3.14±0.63a,b	7.20±1.39b,c	47.4±4.5d	-0.06±0.01d	0.30±0.07b	0.59±0.06a
H5	0.58±0.13e	1.20±0.22e,f	71.9±6.0a	-0.53±0.09a	0.40±0.04a,b	0.47±0.03a
H6	1.61±0.18d	6.41±0.29c	54.6±2.6c,d	-0.17±0.05c	0.46±0.04a	0.61±0.05a
TB1	1.19±0.27d,e	1.89±0.56d,e	69.1±2.8a	-0.27±0.04b	0.43±0.07a,b	0.50±0.06a
TB2	1.31±0.31d	2.33±0.88d	35.5±3.1e	-0.02±0.01e	0.31±0.06b	0.55±0.16a
TB3	2.51±0.25b	9.21±0.84b	51.3±4.6c	-0.04±0.02d,e	0.48±0.05a	0.66±0.06a
TR	3.26±0.40a	8.11±0.47b	62.3±5.5b,c	-0.10±0.01c	0.42±0.02a	0.69±0.05a
TH	0.80±0.18e	3.09±0.77d	33.6±3.9e	-0.25±0.01b	0.34±0.06a,b	0.57±0.08a
CB	2.84±0.74a,b,c	8.06±2.17b,c	33.1±3.3e	-0.07±0.03c	0.45±0.08a,b	0.63±0.06a

a,b,c,d,e,f: Different letters in the same column indicate significant differences ( $p < 0.05$ ). (\*) as indicated in Table 1

The results of TPA showed that hardness varied between 33-72N and adhesiveness between -0.010 and -0.53 Ns. Cohesiveness and springiness values were less varied with ranging from 0.30 to 0.48 and 0.5 to 0.7 x 10<sup>-2</sup> m, respectively.

After applying an analysis of principal components using the data obtained from breaking strength, hardness, adhesiveness, cohesiveness and springiness of cooked meat products (Table 2) as criterion of association, it was possible to distinguish two different clusters. The mean values of each textural property of the different products included in each cluster was calculated and then plotted. As it can be observed in Figure 1 two different textural profiles, arbitrary named I and II, were obtained (Figure 1). These profiles showed significant ( $p < 0.05$ ) differences for textural properties, mainly for breaking strength and adhesiveness and springiness (Figure 1). Profile I showed a high BS and springiness and low adhesiveness. The cooked meat products included in this textural profile were those of the lowest ( $p < 0.05$ ) fat content and the highest pH, and in general with

highest springiness values (Table 1). Textural profile II (Figure 1) had the lowest ( $p < 0.05$ ) BS and springiness, and the highest ( $p < 0.05$ ) adhesiveness. The products showing this textural profile were characterized by the highest ( $p < 0.05$ ) fat content and the lowest pH values (Table 1). Similarly, in a preliminary study (Herrero et al, 2008) reported that the meat cooked sausages (chopped, mortadella and galantines) could grouped in three significant different textural profiles as a function of their rheological properties.

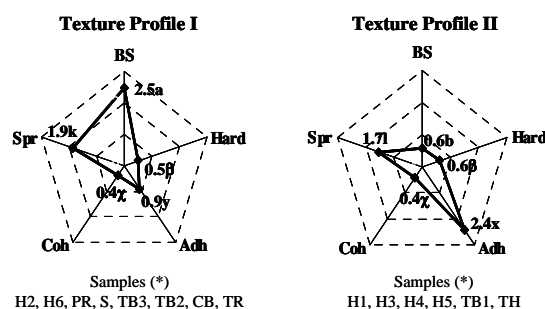


Figure 1. Textural profiles (I and II) and mean values of different textural parameters from cooked ham. BS: Breaking strength (N/cm<sup>2</sup>), Hard: Hardness [(N) x 10<sup>-2</sup>], Adh: Adhesiveness [(N x s) x (-10)], Coh: Cohesiveness, Spr: Springiness [(m) x 3 x 10<sup>-2</sup>]. Mean values with different letter differ significantly ( $p < 0.05$ ): a, b for BS;  $\alpha$ ,  $\beta$  for Hard; x, y for Adh;  $\chi$ ,  $\eta$  for Coh; k, l for Spr. (\*) as indicated in Table 1

### 3.3. Linear regression analysis

Results of simple linear regression analysis indicated that there were significant correlations between some physico-chemical and rheological parameters. In this way, a negative significant correlation ( $p < 0.05$ ) between fat content and BS ( $R^2 = -0.702$ ;  $p < 0.0005$ ) and between fat content and springiness ( $R^2 = -0.537$ ;  $p < 0.05$ ) was observed. In contrast, adhesiveness was positively correlated with fat content ( $R^2 = 0.677$ ;  $p < 0.0005$ ).

Table 3 shows the significant multiple linear regression analyses, using the different textural properties as dependent variables and values from physico-chemical analysis as independent variables. Results revealed a significant correlation between hardness ( $R^2 = 0.519$ ,  $p < 0.0005$ ), adhesiveness ( $R^2 = 0.581$ ,  $p < 0.0005$ ), springiness ( $R^2 = 0.322$ ,  $p < 0.05$ ), BS ( $R^2 = 0.598$ ,  $p < 0.0005$ ) and EF ( $R^2 = 0.260$ ,  $p < 0.05$ ) versus DM, fat content,  $a_w$  and pH (Table 3). The statistical significance of the t-values indicates that only fat content play an important role in the above mentioned parameters. These results were in agreement with some authors who describe the relationship between fat content and textural properties of meat cooked sausages (Rust & Olson 1988; Giese, 1996; Jimenez-Colmenero, 2000; Herrero et al., 2008).

BS correlated positively with springiness ( $R^2 = 0.675$ ;  $p < 0.0005$ ) and negatively with hardness ( $R^2 = -0.581$ ;  $p < 0.005$ ). A positive significant correlation between EF and springiness ( $R^2 = 0.645$ ;  $p < 0.005$ ) was also observed. Multiple linear regression analyses was also performed to determine the degree of association between tensile and TPA parameters (Table 4). Significant coefficients of determination ( $R^2$ ) for BS ( $R^2 = 0.690$ ,  $p < 0.00005$ ) and EF ( $R^2 = 0.527$ ,  $p < 0.00005$ ) versus TPA parameters were found (Table 4). However, the Student's t-values of hardness ( $p < 0.0005$ ), cohesiveness ( $p < 0.005$ ) and springiness ( $p < 0.00005$ ) partial regression coefficients were significant versus BS, and adhesiveness ( $p < 0.005$ ), cohesiveness ( $p < 0.05$ ) and springiness ( $p < 0.005$ ) versus EF, suggesting that only this TPA parameters play a significant role in BS, and EF determination, respectively. In a previously work (Herrero et al., 2008) has been detected a significantly correlated between BS and hardness, cohesiveness, adhesiveness and springiness for cooked meat sausages (such as chopped, mortadellas and galantines). However, the BS of these meat cooked products was only significant correlated with hardness and adhesiveness (Herrero et al., 2008).

Results of the multivariate analysis (Table 4) confirm that the TPA parameters can be use to obtain regression models to predict BS and EF for cooked

meat products. The equations of the fitted models were  $BS = 1.244 - 0.038 \cdot \text{Hardness} - 1.279 \cdot \text{Adhesiveness} - 4.892 \cdot \text{Cohesiveness} + 7.321 \cdot \text{Springiness}$  and  $EF = -8.579 + 0.039 \cdot \text{Hardness} + 8.796 \cdot \text{Adhesiveness} + 9.320 \cdot \text{Cohesiveness} + 15.291 \cdot \text{Springiness}$ . Then, the models of prediction could permit the calculation of BS and de EF of meat cooked sausages using the commonly cylindrical probe of the TPA. Therefore with only a TPA analysis it could be possible to obtain the TPA and tensile parameters.

Table 3. Multiple linear regression analysis of rheological parameters versus dry matter (DM), fat content (% DM), water activity ( $a_w$ ) and pH of cooked meat products

Dependent variable	R <sup>2</sup>	SE	Independent variable	Regression coefficient	t-Values
Hardness	0.519***	9.716	Constant	85.306	
			%DM	-0.171	-0.230
			%fat content	1.028	3.784**
			$a_w$	199.961	0.819
			pH	-36.336	-3.316**
Cohesiveness	0.007	0.079	Constant	1.834	
			%DM	0.004	0.673
			%fat content	0.002	0.912
			$a_w$	-1.594	-0.797
			pH	-0.001	-0.014
Adhesiveness	0.581***	0.099	Constant	-6.967	
			%DM	0.015	2.082*
			%fat content	-0.016	-6.054****
			$a_w$	6.100	2.457*
			pH	0.102	0.926
Springiness	0.322*	0.071	Constant	2.283	
			%DM	0.003	-0.538
			%fat content	-0.006	-3.236**
			$a_w$	-2.435	-1.354
			pH	0.108	1.347
Breaking strength	0.598***	0.741	Constant	20.850	
			%DM	-0.050	-0.837
			%fat content	-0.095	-4.650***
			$a_w$	-29.663	-1.594
			pH	1.905	2.295*
Energy to fracture	0.260*	3.005	Constant	73.170	
			%DM	0.091	0.394
			%fat content	-0.232	-2.775*
			$a_w$	-96.697	-1.281
			pH	4.098	1.217

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.0005$ , \*\*\*\* $p < 0.00005$

SE = standard error;  $R^2$  = Coefficient of determination (Correlation coefficient square)

Table 4. Multiple linear regression analysis of tension mechanical properties versus texture profile analysis parameters of cooked meat products.

Dependent variable	R <sup>2</sup>	SE	Independent variable	Regression coefficient	t-Values
Breaking strength	0.690****	0.575	Constant	1.244	
			Hardness	-0.038	-4.052***
			Adhesiveness	-1.279	-1.442
			Cohesiveness	-4.892	-2.971**
			Springiness	7.321	5.473****
Energy to fracture	0.527****	1.763	Constant	-8.579	
			Hardness	0.039	1.355
			Adhesiveness	8.796	3.440**
			Cohesiveness	9.320	2.035*
			Springiness	15.291	4.050***

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.0005$ , \*\*\*\* $p < 0.00005$

SE = standard error;  $R^2$  = Coefficient of determination (Correlation coefficient square)

#### 4. Conclusions

The determination of breaking strength and energy to fracture by tensile test can be used together with the TPA, to determine rheological features of cooked meat products manufactured from different entire pieces (such as ham and shoulder from pork and breast and thigh from poultry). Both analyses produced complementary information which permits grouped these cooked meat products into two different textural profiles. These textural profiles are characterized mainly by the values of breaking strength, springiness and adhesiveness. The meat products included in each textural profile showed also different physico-chemical characteristics such as fat content and pH.

The multivariate analysis confirms that TPA parameters (hardness, adhesiveness, cohesiveness and springiness) could be used to construct regression models to predict tensile parameters (breaking strength and energy to fracture).

#### Acknowledgements

The present work received financial support from projects AGL2010-19158, AGL2010-19515 and CSD 2007-00016 (CONSOLIDER INGENIO 2010) funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation.

#### References

- Bourne, M. C. (1978). Texture profile analysis. *Food Technology*, 32, 62-66.
- Bourne, M. C., (2002). Principles of objective texture measurement. In M. C. Bourne, (Ed.), *Food texture and viscosity: Concept and measurement*. San Diego, USA, pp. 107-188.
- Cheng, Q., Sun D. W., & Scannell, A. G. M. (2005). Feasibility of water cooking for pork ham processing as compared with traditional dry and wet air cooking methods *Journal of Food Engineering*, 67, 427-433.
- Christensen, M., Purslow, P. P., & Larsen, L. M. (2000). The effect of cooking temperature on mechanical properties of whole meat, single muscle fibres and perimysial connective tissue. *Meat Science*, 55, 301-307.
- Christensen, M., Young, R. D., Lawson, M. A., Larsen, L. M., & Purslow, P. P. (2003). Effect of added I-calpain and post-mortem storage on the mechanical properties of bovine single muscle fibres extended to fracture. *Meat Science*, 66, 105-112.
- Desmond, E. (2006). Reducing salt: A challenge for the meat industry. *Meat Science*, 74, 188-196.
- Desmond, E. M., & Kenny T. A. (2005). Effect of pelvic suspension and cooking method on the processing and sensory properties of hams prepared from two pork muscles. *Meat Science*, 69, 425-431.
- Desmond, E. M., Kenny, T. A., Ward, P., & Sun D. W. (2000). Effect of rapid and conventional cooling methods on the quality of cooked ham joints. *Meat Science*, 56, 271-277.
- Giese, J. (1996). Fats, oils and fat replacers. *Food Technology*, 50, 78-83.
- Hanson, S. W. F., & Olley, J. (1963). Application of the Bligh and Dyer method of lipid extraction to tissue homogenates. *Biochemical Journal*, 89, 101-120.
- Herrero, A. M., Ordóñez, J. A., Romero de Avila, M. D., Herranz, B, de la Hoz, L, & Cambero, M. I. (2007). Breaking strength of dry fermented sausages and their correlation with Texture Profile Analysis (TPA) and physico-chemical characteristics. *Meat Science*, 77, 331-338.
- Herrero, A. M., de la Hoz, L., Ordoñez, J. A., Herranz, B, Romero de Avila, M. D. & Cambero, M. I. (2008). Tensile properties of meat cooked sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) parameters and physico-chemical characteristics. *Meat Science*, 80, 690-696.
- Honikel, K. O. (1998). Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat Science*, 49, 447-457.
- Jiménez-Colmenero, F. (2000). Relevant factors in strategies for fat reduction in meat products. *Trends in Food Science and Technology*, 11, 56-66.
- Kemi, V. E., Kärkkäinen, M. U., & Lamberg-Allardt, C. J. E. (2006). High phosphorus intakes acutely and negatively affect Ca<sup>2+</sup> and bone metabolism in a dosedependent manner in healthy young females. *British Journal of Nutrition*, 96, 545-552.
- Lepetit, J., & Culioli, J. (1994). Mechanical properties of meat. *Meat Science*, 36, 203-237.
- Lewis, G. J., & Purslow, P. P. (1989). The strength and stiffness of perimysial connective tissue isolated from cooked beef muscle. *Meat Science*, 26, 255-269.
- Mutungi, G., Purslow, P., & Warkup, C. (1995). Structural and mechanical changes in raw and cooked single porcine muscle fibres extended to fracture. *Meat Science*, 40, 217-234.
- Ruusunen, M., & Puolanne, E. (2005). Reducing sodium intake from meat products. *Meat Science*, 70, 531-541.
- Rust, R., & Olson, D. (1988). Making good "lite" sausage. *Meat and Poultry*, 34, 10-16.
- Santos, C., Ordoñez, J. A., Cambero, M. I., D'Arrigo, M., & de la Hoz, L. (2004). Physicochemical characteristics of an  $\alpha$ -linolenic acid and  $\alpha$ -tocopherol enriched cooked ham. *Food Chemistry*, 88, 123-128.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., Vandekinderen, I., Rajtak, U., & Debevere, J. (2006). The sensory acceptability of cooked meat products treated with a protective culture depends on glucose content and buffering capacity: A case study with *Lactobacillus sakei* 10A. *Meat Science*, 74, 532-545.
- Válková, V., Saláková, A., Buchtová, H., & Tremlová, B. (2007). Chemical, instrumental and sensory characteristics of cooked pork ham. *Meat Science*, 77, 608-615.
- Willems, M. E. T., & Purslow, P. P. (1996). Effect of postrigor sarcomere length on mechanical and structural characteristics of raw and heat denatured single porcine muscle fibres. *Journal of Texture Studies*, 27, 217-233.

**ARTÍCULO 1.4.**

**A study of the mechanical properties of dry cured ham**

**Meat Science. (2013). En revisión.**



Ms. Ref. No.: MEATSCI-D-13-00690

Title: A study of the mechanical properties of dry-cured ham

Meat Science

Dear Isabel,

Your submission entitled "A study of the mechanical properties of dry-cured ham" will be handled by Editor David Hopkins, B. Agr.Sc., M. Agr. Sc., PhD.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/meatsci/>.

Your username is: [icambero@vet.ucm.es](mailto:icambero@vet.ucm.es)

If you need to retrieve password details, please go to:

[http://ees.elsevier.com/meatsci/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/meatsci/automail_query.asp)

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System

Meat Science



# A study of the mechanical properties of dry-cured ham

M. Dolores Romero de Ávila, Rosa Escudero, Juan A. Ordóñez, M. Isabel Cambero\*

Dpto. Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Spain

## ABSTRACT

The breaking strength ( $\sigma$ ) and stress-strain relation of several muscles [*biceps femoris* (BF), *semitendinosus* (ST) and *semimembranosus* (SM)] and the subcutaneous fat (SF) from a Spanish dry cured ham (Protected Designation of Origin of white ham from “Teruel”) have been analyzed by the uniaxial tensile test in order to predict the mechanical behaviour of this meat product. Thirty pieces were analyzed and the stress-strain curves were obtained. A high dispersion was obtained for  $\sigma$  questioning the assumption that this parameter is given as an average of the experimental results. The Weibull distribution permits the  $\sigma$  of each tissue to be described in terms of fracture probability. The Weibull parameter characteristic strength, at which the probability of failure is 63%, was greater for SM and SF (25-26 N cm<sup>-2</sup>). The low values of the Weibull modulus (between 1 and 2) indicate that dry-cured ham tissues behave as brittle materials under tensile load. The stress-strain curves present distinct and characteristic forms for each tissue, which may be associated with their composition and the extent to which they are affected by the curing process.

**Keywords:** breaking strength, tensile testing, dry-cured ham, Weibull analysis, mechanical properties.

## 1. Introduction

Textural characteristics of food are important aspects for consumer acceptance. Food texture is defined as “all the rheological and structural (geometric and surface) attributes of the product perceptible by means of mechanical, tactile, and, where appropriate, visual and auditory receptors” (Lawless & Heymann, 1998). Food rheology, the material science applied to foods, investigates the relationships among stress, strain and time scale of foods to understand the effects of processing on products, probe the system structure and reveal critical aspects of food texture (Foegeding, Brown, Drake, & Daubert, 2003). The rheological behaviour of food can be evaluated using large strain methodologies (compression, torsion, or tension), which may be performed empirically or fundamentally (Bourne, 2002; Kilcast, 2004; Foegeding et al., 2003). Currently, the most commonly used instrumental method is probably the compression method of Texture Profile Analysis (TPA). This empirical method mimics the conditions to which the material is subjected throughout the food mastication process (Bourne, 1978; Scott-Blair, 1958). The compression parameters obtained with TPA have been employed by many authors in their evaluations of meat products (Bruna, Fernández, Hierro, Ordóñez, & de la Hoz, 2000; Houben & van't

Hooft, 2005; Hoz, D'Arrigo, Cambero, & Ordóñez, 2004; Visessanguan, Soottawat, Riebroy, & Thepkasikul, 2004).

Among the essential methods that can be used to study the rheological behaviour, the tensile test is the best suited for structural investigations (Purslow, 1985) rather than to make a sensory evaluation of tenderness. The test can be carried out on raw or cooked meat. A conventional uniaxial tensile test assumes that the sample fractures are in an approximately perpendicular plane to that of the applied tension. The performance of this test allows to obtain a load deformation curve (stress-strain curve) to complete rupture, in which the fracture strength corresponds to the maximum force supported by the material. Other parameters from the load deformation curve can be measured, including breaking strength, total energy to fracture, modulus of elasticity and breaking strain (Bourne, 2002; Honikel, 1998).

The tensile test has been used to monitor the mechanical properties of myofibres during *rigor mortis* onset and after rigor (Lepetit & Culioli, 1994; Willems & Purslow, 1996), to study the changes of mechanical tension properties of single meat fibres during *post-mortem* storage (Christensen, Young, Lawson, Larsen & Purslow, 2003), and to determine the effect of cooking temperature on whole meat, single muscle fibres and perimysial connective

\* Author to whom the correspondence should be addressed: M. I. Cambero, Departamento Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense. 28040 Madrid. Spain. Phone: +34 913943745; Fax: +34 913943743  
E-mail: [icambero@vet.ucm.es](mailto:icambero@vet.ucm.es) (M.I. Cambero)



tissue (Lepetit et al., 1994; Lewis & Purslow, 1989; Mutungi, Purslow, & Warkup, 1995, 1996; Willems et al., 1996; Christensen, Purslow, & Larsen, 2000). However, there is little information about tensile measurements on other meat products, namely dry cured ham, in spite of their repercussions and importance for the appropriate handling (e.g. the assessment of their behaviour in the slicing and packing processes) of this products.

The data obtained by tensile test could offer valuable complementary information about dry cured ham behaviour against both slicing operation and vacuum packaged (with or without interleaving sheets). When these packages are opened and the ham slices are taken out, many of them break because the product breaking strength is less than the superficial adhesion force between the product surfaces (mainly when no interleaving sheets are between slices). To solve this problem it would be useful to know if a meat product is suitable to be sliced and vacuum packed, i.e., slices with a breaking strength greater than the resistance offered by the adhered portions.

In general, meat and meat products are not isotropic and, therefore, they exhibit distinct mechanical properties in different directions. Only in meat products with a homogeneous structure, such as those elaborated from meat emulsion (that do not contain small lumps of meat or fat or of other ingredients) gelled by heating, can be assumed to present an isotropic behaviour. However, the meat products obtained by processing anatomical parts (e.g. loin or ham cooked or cured) show a non-isotropic behaviour. Moreover, they present varying strengths due to their internal structure, including different tissues (muscle, fat and connective tissue) in different proportions and degrees of overlap and different chemical composition. This leads to great variability in the estimation of their mechanical parameters (such as breaking strength). Furthermore, no specific strength values may be obtained reflecting their mechanical behaviour. Usually the rheological and mechanical properties of the meat products are given as mean values with their corresponding deviation or standard error. However, several statistical tools may be used to obtain more accurate information about these properties, especially to determine the mechanical properties of a non-isotropic meat product, including the breaking strength. One of these statistical analyses is the Weibull distribution, which is usually used for the determination of static and dynamic mechanical properties of several materials (Weibull, 1959; Borrero-López, Hoffman, Bendavid, & Matin, 2009). The Weibull distribution has the ability to model experimental data of very varied nature (Dirikolu, Aktaş, & Birgören, 2002), which is

one of the reasons for its wide utilisation. Weibull's analysis of fracture is based on a weakest link hypothesis, in which the strength of a body involves the products of survival probabilities of the individual volume elements, so that failure of the whole body will take place as soon as the material strength is surpassed at one element containing the critical flaw (Borrero-López et al., 2009). The weakest link hypothesis implicitly assumes that there is no interaction between the flaws. Weibull assumed a power-law probability function for the survival of the elements, which is integrated over the volume of the body (Weibull, 1959).

Spain is a traditional manufacturer of cured meat products and the ham is the most emblematic product with the highest commercial value. It makes a significant contribution to the Spanish economy. The Spanish population consumes approximately 3.2 kg of dry-cured ham *per capita* per year (Martín, 2010). Dry cured ham is produced throughout the entire country, but certain manufacturing differences exist in production according traditional recipes of the geographical areas (Martín-Bejarano, 2001; Ventanas, Ruiz, & Córdoba, 2001). The dry cured ham is a non-homogeneous product that undergoes a salting process and then is subjected to a long dehydration/ripening period (usually more than 1 year) during which the dynamics of the migration of the water and salts is balanced (NaCl, nitrate and nitrite) (Arnau, Guerrero, Casademont, & Gou, 1995) and the characteristic flavour is developed. Basically, there are two types of Spanish dry cured ham related to the breed used: white and Iberian hams. To control the quality and to avoid imitations, most of the Spanish hams are covered by different quality designations, according to the European Union systems for developing and protecting regional foods (European Commission 1996, 1999). White hams are usually ripened during 10 –20 months, which is normally carried out in drying rooms (Ockerman, Basu, León Crespo, & Cépedes, 2002). An important part of the production comes under Protected Designation of Origin (PDO) of Spanish white ham, “*Jamón de Teruel*” (MAPA, 1993; European Commission, 2006), which is produced in a inner geographical area (about 800 meters above sea level) located at the Northeast of Spain from white pigs fed with commercial feeding and a minimum of 9 months of air-curing. This PDO has had the highest sales over the past few years, with sales of more than a million units in 2009 corresponding to approximately 45% of the annual production in relation to the other PDOs in Spain (MARM, 2009).

The aim of this work was to apply uniaxial tensile tests to dry-cured hams to illustrate the extent to which the breaking strength may vary and to obtain

the stress-strain curves in order to provide a complete characterization of the mechanical behaviour of this meat product. With this aim, samples from the *biceps femoris* (BF), *semitendinosus* (ST), (both as model of internal muscle), and *semimembranosus* (SM), (as an external-type), muscles and the subcutaneous fat (SF) were taken. In the present paper, the Weibull distribution was employed to model a mechanical property of the above mentioned tissues of a traditional Spanish dry-cured ham, but could also be used in other meat products and other features with similar high variability.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Description of the samples

Thirty Spanish dry-cured hams from different commercial brands were purchased in retail shops. All dry-hams were elaborated following the procedure of "Protected Designation of Origin (PDO)".

It is manufactured from white pigs reared in the Teruel region (Spain). The fresh legs (with a weight over 11 kg and a fat cover of around 4–5 cm) were ripened in the area above mentioned. The typical production process includes the following steps: salting, washing-brushing, resting or post-salting, drying-ripening and refinement by ageing (cellar phase). In the salting procedure, first, there is usually a pre-salting of the fresh legs, in which the leg surfaces are rubbed manually with curing salts. Then, the legs are covered with coarse sea salt during about 0.75–1 day per kilo of fresh material. After removing the salt by brushing, the pieces were placed in a chamber for 45–90 days, at 3–6 °C and 80–90% relative humidity. Finally, the hams were kept in ripening rooms (14 °C, 68–76% relative humidity). The dry-cured hams analysed in this study corresponded to the left leg of the hogs with a final weight of about 8.5 kg and they were cured for 12 months of cured. Samples from muscles and tissues above mentioned were taken from each dry-ham 5 °C until analysis.

### 2.2. Physico-chemical analysis

Dry matter (DM), pH, water activity ( $a_w$ ) and salt content were determined in duplicate samples. For analyses, portions of about 200 g were finely cut. DM was determined by drying the sample at 110 °C to constant weight and the results were expressed as a percentage (AOAC, 2006). The pH was determined in a distilled water homogenate (1/9, w/v) of the sample (10 g) using a Crison Digit-2001 pH meter (Crison Instruments LTD, Barcelona, Spain). The  $a_w$

was measured using a Decagon CX1 hygrometer (Decagon Devices Inc., Pullman, WA, USA) at 25 °C. The salt content (chlorine as sodium chloride) was determined by AOAC method 935.47 (AOAC, 1995).

### 2.3. Tensile test

Uniaxial tensile test was performed using a TA.XT2i SMS Stable Micro Systems Texture Analyser (Stable Microsystems Ltd., Surrey, England) with the Texture Exponent programmes. The test was carried out at about 22 °C. A minimum of three rectangular pieces (about 9.0 x 3.0 cm and 0.2 cm thickness) of each tissue were taken per ham using an electric slicer meat cutter machine (mod. SP 300 CE DOM, Beckers, Italy) to obtain the correct thickness and a thin-bladed sharp knife (to adjust rectangular piece dimensions). In accordance with previous works (Honikel, 1998; Herrero, Ordóñez, Romero de Ávila, Herranz, de la Hoz, & Cambero, 2007; Herrero, de la Hoz, Ordóñez, Herranz, Romero de Ávila, & Cambero, 2008), these pieces were cut in a dumb-bell shape, approximately 4.0 x 1.0 cm in the narrowest zone and 0.2 cm thickness per sample. To obtain the dumb-bell shape from a continuous cut and a smoothly contoured surface, one sheet-metal cutting mould, of the same shape and the same dimensions and with sharpened cutting edges, was manufactured. To minimize damage, samples were separated from the cutting moulds using a scalpel when adhesions occurred. The muscles samples were cut parallel to the fibre direction. The subcutaneous fat samples (surrounding the *biceps femoris* muscle) were cut parallel to the muscle surface. After cutting, the width and thickness in the centre of the samples were checked with a calliper (Digit Cal, Tesa, Brown and Sharpe, Swiss). The above dimensions were considered to calculate the original cross-sectional area of the test-piece.

For uniaxial tensile analysis a load cell of 5 kg was employed. Each sample was gripped between two tensile grips (A/MTG), one fixed to the base of the textural analyser and the other one attached to the load cell. Initial grip separation was 2.5 cm and the samples were subjected to extension at a strain rate of 1.0 mm/s until rupture (Herrero et al., 2007). The curves of stress [engineering stress or ratio of applied force (F) to the area (S) over which it acts,  $stress=F/S$ ] and strain [increase in sample length ( $L-L_o$ ) as the result of applied stress divided by de original length ( $L_o$ ),  $strain=(L-L_o)/L_o$ ] were obtained using the recorded data by Texture Exponent Programmes (Stable Microsystems Ltd., Surrey, England) and the Origin 8.0 program. The cross-sectional area (thickness x width) of the sample was considered to calculate the stress (N cm<sup>-2</sup>). Breaking strength or ultimate tensile strength, corresponded

to the maximum stress that samples can withstand while being stretched before breaking (stress at fracture) and it was taken as the highest point of the stress-strain curve (Herrero et al., 2007, 2008). To calculate the breaking strength ( $\sigma$ ), only results for those test-samples which fractured in around the centre of the dumb-bell shape were recorded. Analysis was continued until at least three  $\sigma$  values for each tissue per dry-cured ham rate of testing were obtained.

#### 2.4. Weibull distribution

Measured  $\sigma$  of the dry-cured ham samples were fitted to the probability of fracture ( $P_f$ ) by the Weibull distribution (Trustum & Jayatilaka, 1979):

$$P_f = 1 - \exp [-(\sigma - \sigma_u / \sigma_0)^m] \quad (1)$$

where  $\sigma_0$  is the characteristic strength (scale parameter),  $m$  is known as the Weibull modulus (shape parameter) and  $\sigma_u$  is the minimum strength below which no failures will occur.

The characteristic strength,  $\sigma_0$ , is the stress at which the probability of failure is 63%. In fracture strength studies, the minimum strength,  $\sigma_u$ , is usually assumed to be equal to zero (Weibull, 1959; Davies, 1973; Lawn, 1993; Wachtman, 1996; Dirikolu et al. 2002; Borrero-López et al., 2009), resulting in a two-parameter distribution. Then, the fracture probability ( $P_f$ ) for a given uniaxial stress ( $\sigma$ ) was calculated using the equation:

$$P_f = 1 - \exp [-(\sigma / \sigma_0)^m] \quad (2)$$

where  $\sigma_0$  is the characteristic strength in the considered geometry.

#### 2.5. Statistical analysis

The differences among the means were established by ANOVA and Duncan's multiple comparison procedure (at 95% or 99% of confidence level). To check the normal distribution (90% confidence) of samples, the Shapiro-Wilks test was applied. When samples fitted the normal distribution, one-way ANOVA analysis was performed. When samples did not fit the normal distribution, the Kruskal-Wallis test was used to test the null hypothesis that the medians of variables within each of the levels of samples were the same. The statistical analysis was carried out using a Statgraphics Plus version 5.0. Data were presented as the mean values and 95 % confidence interval.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Physico-chemical analysis.

Dry matter (DM) content of the dry ham samples from muscles selected as model (BF, ST and SM of muscles ranged from 42 to 60 g/100 g product). In agreement with Gou, Comaposada, & Arnau, 2004, SM muscle (57.67 g/100 g product, 95% confidence interval: 55.13 - 60.21) showed higher dry matter content ( $p < 0.05$ ) than BF (45.70 g/100g product, 95% confidence interval: 42.19 - 49.20) and ST (50.60, 95% confidence interval: 48.60 - 52.59). The SF showed ( $p < 0.05$ ) the highest DM (88.27, 95% confidence interval: 83.85 - 92.69) and the lowest  $a_w$  (0.82, 95% confidence interval: 0.80 - 0.85). No significant differences ( $p > 0.05$ ) were observed between the  $a_w$  (with values in the interval 0.88 - 0.90,) and pH (in the range 5.9 - 6.4) values of the three muscle studied. The highest, NaCl content ( $p < 0.05$ ) was observed in BF muscle (10.49 % of DM, 95% confidence interval: 9.55 - 11.73,) followed by SM and ST, with values of 7.12 % of DM (95 % confidence interval: 7.02 - 8.40) and 6.31 % of DM (95 % confidence interval: 5.43 - 7.27), respectively. This result is in agreement with the findings obtained by several authors (Arnau et al., 1995; Gou et al., 2004; Fantazzini, Gombia, Schembri, Simoncini, & Virgili, 2009), who reported that BF is usually the muscle with the highest NaCl content at the ripening of the process period. The lowest NaCl content was that of the SF (0.56 % of DM, 95 % confidence interval: 0.39 - 0.73). In relation to this result, diffusivity values of NaCl have been reported to be eight times lower in SF than in lean meat (Fox, 1980). In general, the estimated parameters are within the normal range described for different Spanish dry-cured ham under the PDO denomination Teruel (Arnau et al., 1995; Fernández, Ordóñez, Cambero, Santos, Pin, & Hoz, 2007; Santos, Hoz, Cambero, Cabeza, & Ordóñez, 2008).

#### 3.2. Breaking strength analysis

The breaking strengths ( $\sigma$ ) (mean values and 95% confidence intervals) obtained by tensile testing of BF, ST and SM muscles and SF of dry-cured hams are given in Table 1. A great dispersion of the  $\sigma$  values was observed. In general, SM had high-values, ranged from 17.3 to 29.2 N cm<sup>-2</sup> (Table 1), while the figures of the ST were the lowest (8.5 - 13.0 N cm<sup>-2</sup>). The BF showed intermediate  $\sigma$  values (11.1 - 21.8 N cm<sup>-2</sup>), which were similar to those detected by other authors (Herrero et al., 2007, 2008; Hoz, Cambero, Cabeza, Herrero, & Ordóñez, 2008). The  $\sigma$  for SF fell to between 17.4 and 27 N cm<sup>-2</sup>.

**Table 1.** Breaking strength, elastic limit (mean values and 95% confidence intervals), Weibull modulus ( $m$ ), correlation coefficient ( $R^2$ ) of the Weibull distribution equation (from Figure 1)\* and characteristic strength ( $\sigma_\theta$ ) for different tissues of dry-cured ham

Tissue	Breaking strength (Ncm <sup>-2</sup> )	$m$	$R^2$ *	$\sigma_\theta$ (Ncm <sup>-2</sup> )	Elastic limit (Ncm <sup>-2</sup> )
<i>Biceps femoris</i> muscle	16.47 (11.10, 21.84)	1.25	0.96	18.77	10.81 (8.73, 13.55)
<i>Seminembranosus</i> muscle	23.26 (17.31, 29.21)	1.91	0.96	26.31	20.05 (14.16, 25.92)
<i>Semitendinosus</i> muscle	10.73 (8.49, 12.98)	2.23	0.92	12.19	8.21 (8.07, 13.55)
<i>Subcutaneous</i> fat	22.19 (17.40, 26.99)	1.98	0.98	25.09	18.05 (12.52, 23.59)

### 3.3. Weibull parameters

The Weibull distribution is used to model extreme values such as breaking times and breaking strengths. The two- and three-parameter distribution is a typical way to display the Weibull model. In this study, the two-parameter option was selected since it has been previously used in several studies on fracture strength (Borrero-López et al., 2009; Foschi & Barrett, 1975; Davies, 1973; Scanlon & Long, 1995; McLaughlin, 1987; Sullivan & Lauzon, 1986). According to Ghosh (1999) for specimens with the same shape and size the cumulative distribution function considered was:

$$P_f = 1 - \exp [-(\sigma/\sigma_\theta)^m] \quad (2)$$

In the context of this study of tensile specimens subjected to a stress,  $P_f$  represents the probability that the fracture strength is equal/less to  $\sigma$  (Ghosh, 1999),  $\sigma_\theta$  the characteristic strength or scaling parameter and  $m$  the Weibull modulus, while the reliability ( $P_R$ ) is the probability that the fracture strength is at least  $\sigma$ , corresponding to the function (Dodson, 1994):

$$P_R = \exp [-(\sigma/\sigma_\theta)^m], \quad (3)$$

according to the equality:

$$P_f + P_R = 1 \quad (4)$$

Although are several methods (linear regression, the maximum likelihood, and the method of moments), in this was used the linear regression since it is commonly used for the statistical analysis of the fracture strength of several materials when Weibull's distribution is applied. In the linear regression method, from the initial distribution function, is transformed, by applying natural logarithm, in the expression:

$$1 - P_f = \exp [-(\sigma/\sigma_\theta)^m] \quad (5)$$

and applying double logarithms to both sides, the following linear regression model is obtained:

$$\ln[\ln(1/(1 - P_f))] = m \ln(\sigma) - m \ln(\sigma_\theta) \quad (6)$$

A total of 30 samples of  $\sigma$  were used to estimate  $P_f$  from experimental data for each muscles and fat tissues. In order to obtain  $m$  and  $\sigma_\theta$ , these  $\sigma$  values were arranged from smallest to largest and the order number ( $i$ ), between 1 and  $n$ , was considered so that  $i=1$  which was related to the smallest experimental data ( $\sigma_i$ ) and  $i=n$  corresponded to the largest experimental data ( $\sigma_n$ ). Then, a good estimate of  $P_f$  is the median rank of  $\sigma_{(i)}$ , calculated from the expression (Dirikolu et al., 2002):

$$P_{fi} = (i - 0.3) / (n + 0.4) \quad (7)$$

Figure 1 shows the Weibull plots, based on least squares minimisation, applied to the paired values  $\{\ln(\sigma_{(i)}) \text{ versus } \ln[\ln(1/(1 - P_{fi}))]\}$ , as X and Y values, respectively for each muscle and SF. The values of the shape parameter  $m$  or Weibull modulus, was obtained as the slope values of the linear regression models for each tissue. The  $\sigma_\theta$  values, or characteristic strengths, were calculated using the point at which the line defined by the regression model intersects the Y axis (value of Y when X=0) in the expression:

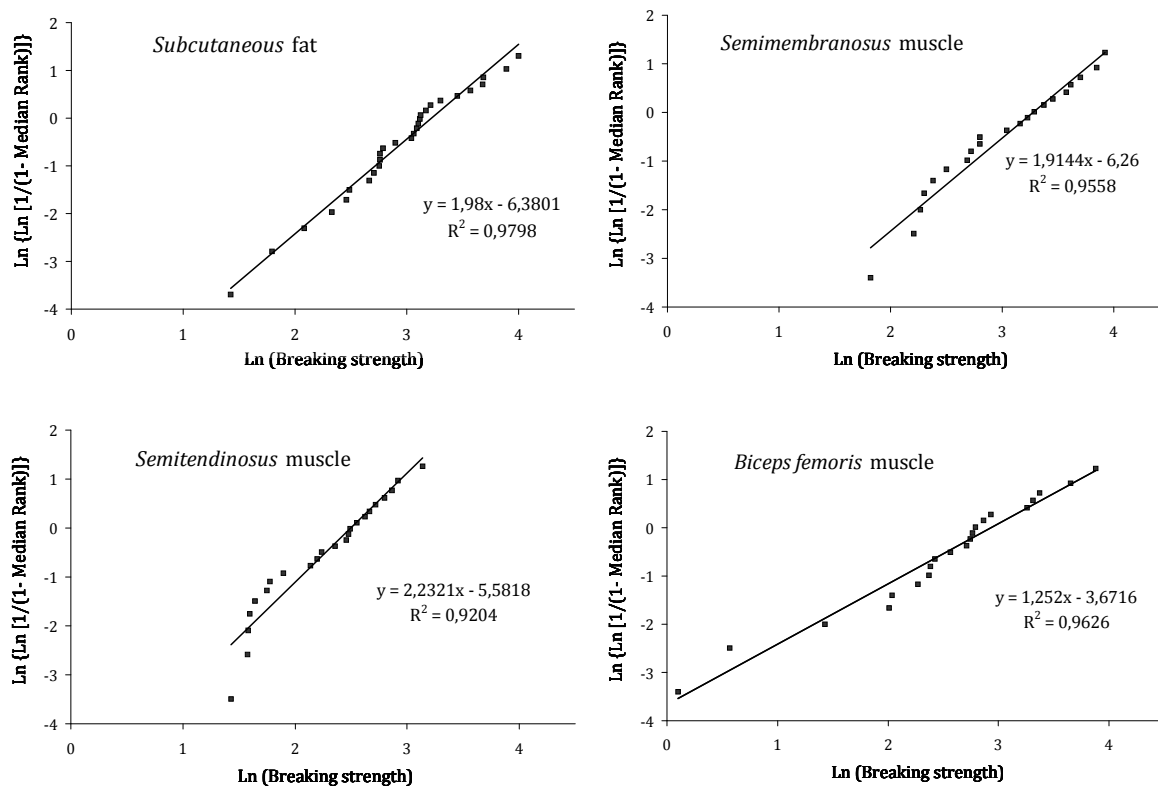
$$\sigma_\theta = e^{(-Y/m)} \quad (8)$$

This parameter measures the spread in the distribution of data.

Table 1 shows the Weibull modulus, characteristic strength and the correlation coefficient ( $R^2$ ) of the linear regression Weibull model for each muscle and SF. In each case, a good linear relationship,  $R^2$  0.92 - 0.98, values were obtained, suggesting that the experimental data can be reasonably described by the Weibull distribution equation. Figure 1 showed linear regression model for muscles and SF. For BF the linear regression model was  $Y=1.252 X - 3.672$ ,  $R^2 = 0.963$ . Therefore, the  $m$  and  $\sigma_\theta$  values will be 1.252 and 18.77 N cm<sup>-2</sup> respectively. The plot of  $P_f = 1 - \exp [-(\sigma/\sigma_\theta)^m]$  is shown in Figure 2. This muscle would break with 99% of probability for a stress of 48.79 N cm<sup>-2</sup> or more but could remain free of fracture, with a high reliability (> 0.85), when subjected to a tension less than or equal to 4 N cm<sup>-2</sup>. A similar behaviour was observed for SM ( $Y=1.914 X - 6.26$ ;  $R^2 = 0.956$ , Figure 1). In this muscle, the  $m$  and  $\sigma_\theta$  values were 1.914 and 26.31 N cm<sup>-2</sup> respectively. When the curve of fracture probability was plotted (Figure 2) to consider the percentage of samples of SM that have at least a specific  $\sigma$ , this muscle was found to fracture with a 99% probability for a tension of 50.8 N cm<sup>-2</sup> or more. However, a tension less than 8 N cm<sup>-2</sup> would not break the samples with a  $P_R$  of 0.90. The

ST muscle showed the highest Weibull modulus ( $Y=2.232 X - 5.58$ ;  $R^2 = 0.92$ , Figure 1) and the lowest  $\sigma_\theta$  value ( $12.19 \text{ N cm}^{-2}$ ). As can be observed in Figure 2, for this muscle, an strength of  $23 \text{ N cm}^{-2}$  or more would be enough to cause the breakage of

the samples with 99% probability. The sample would only be completely free of rupture (with reliability  $>0.85$ ) at a tension lower than or equal to  $4 \text{ N cm}^{-2}$ .



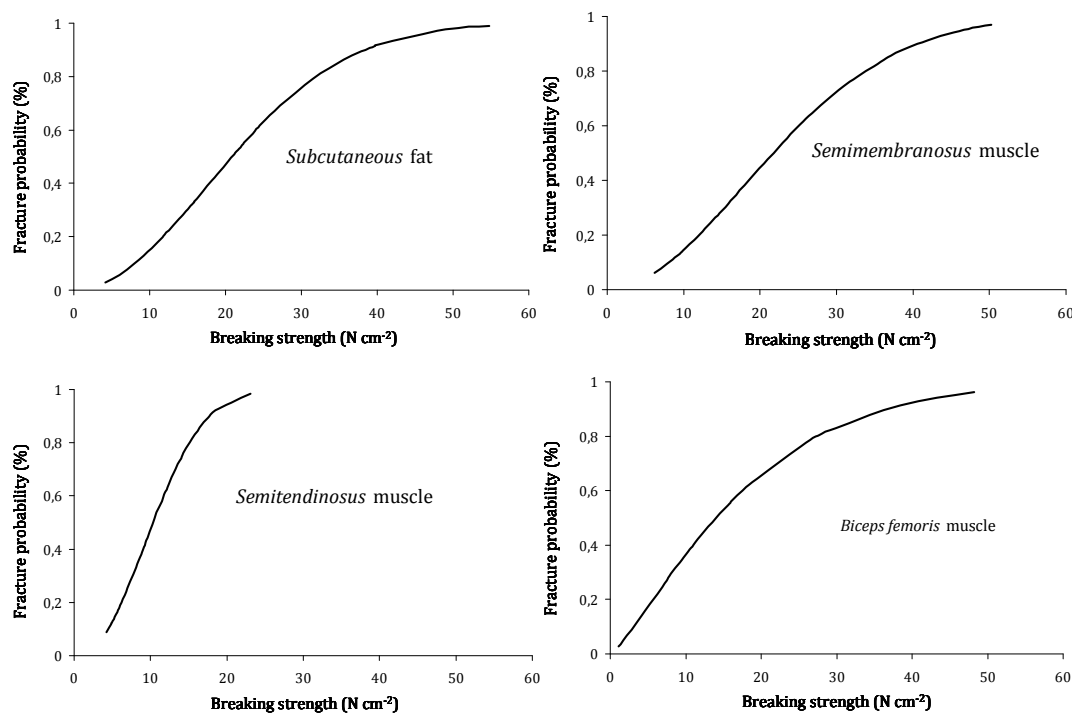
**Figure 1.** Weibull plots of tensile breaking strength taken from 30 samples for different tissues from dry cured hams

The SF showed similar values to  $m$  (1.98) and  $\sigma_\theta$  ( $25.09 \text{ N cm}^{-2}$ ) as the SM muscle. For the complete rupture of this tissue with a reliability of 99 % a stress of at least  $54.5 \text{ N cm}^{-2}$  would be required. The application of stresses lower than  $4 \text{ N cm}^{-2}$  would not cause the fat to rupture (with  $P_R$  levels of 0.90).

Since the Weibull modulus reflects the degree of variation in the strength of the samples tested, a higher  $m$  value denotes a narrower distribution of fracture stresses (Zhao, Ma, & Xu, 2008). It has been reported (Dirikolu et al., 2002) that  $m < 1.0$  mean that the material has a decreasing failure rate. Similarly,  $m = 0$  indicates a constant failure rate and  $m > 1.0$  indicates an increasing failure rate. The  $m$  values from the tissues studied were relatively low (between 1 and 2), which would be associated with brittle materials (Johnson & Haskell, 1983; Scanlon et al., 1995) and it could indicate, in accordance with Klein (2009) flaws in the tissues of dry-cured ham are clustered inconsistently. Consequently, the behaviour of these tissues would be represented better as a distribution of values, such as the

probability of failure, rather than as a single average of the experimental results.

The highest  $m$  for ST (Table 1) indicates that this muscle tends to fracture with a higher probability than SF, SM and BF. The characteristic strength or scale parameter ( $\sigma_\theta$ ) is an indicator of the statistical dispersion of the probability distribution.  $\sigma_\theta$  is considered as an average value of the sample. The SM ( $26.31 \text{ N cm}^{-2}$ ) and SF ( $25.09 \text{ N cm}^{-2}$ ) showed the highest  $\sigma_\theta$  with a probability of failure of 63% (Table 1), whereas half this strength ( $12.19 \text{ N cm}^{-2}$ ) was sufficient to tear ST muscle with the same probability BF showed an intermediate value  $18.77 \text{ N cm}^{-2}$ . The differences in these parameters ( $m$  and  $\sigma_\theta$ ) and in the  $\sigma$  undoubtedly reflect the structural characteristics of the different muscles, mainly the amount of collagen, intramuscular fat and the size of the sarcomere (Kristensen & Purslow, 2001; Wheeler, Shackelford, & Koohmaraie, 2000) and the way in which these are affected by the dry-cured processing of the ham.



**Figure 2.** Probability of fracture of different tissues from dry-cured ham estimated by Weibull distribution

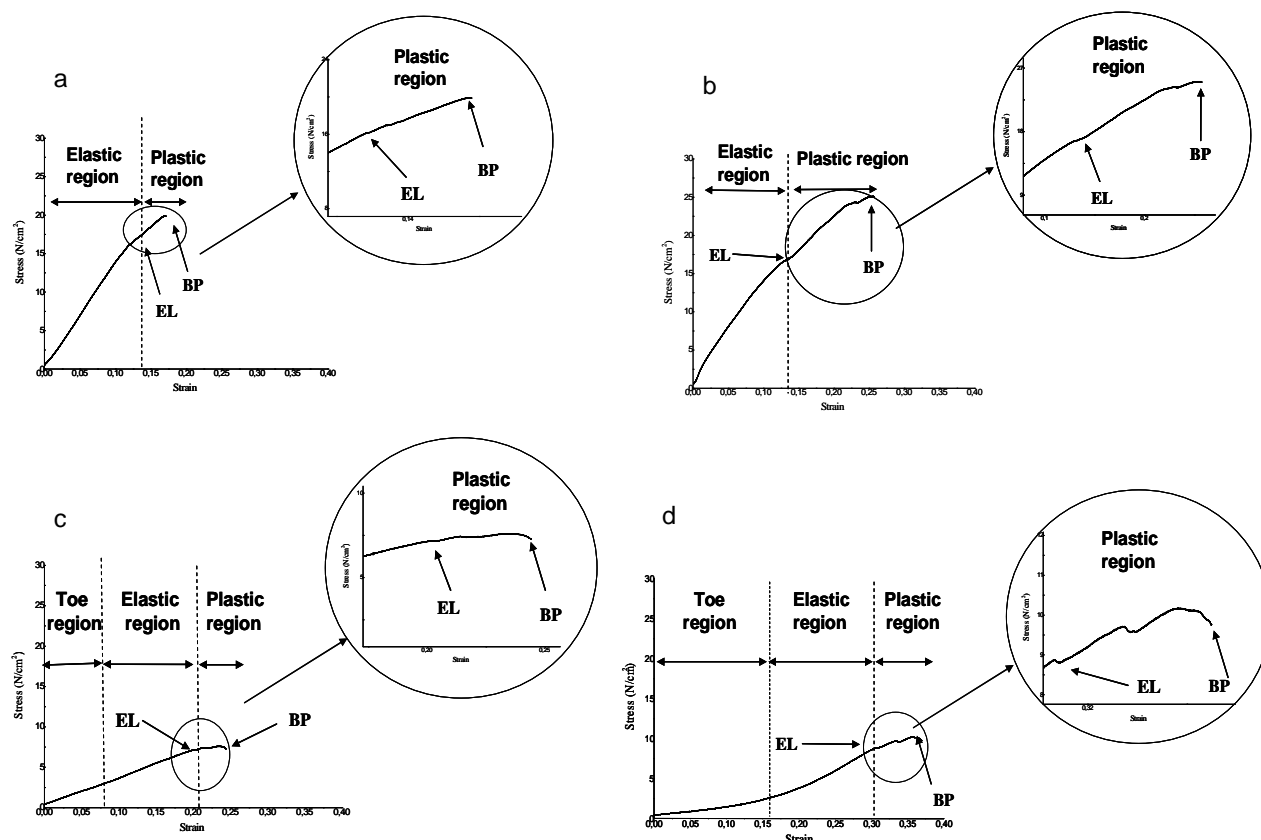
#### 3.4. Stress-strain curves and presumptive deformation mechanisms

A typical stress-strain curve obtained by tensile testing of BF, ST, SM *muscles* and SF from dry-cured hams is presented in Figure 3. The stress-strain curves can be used to conduct a comparative study into the behaviour of the samples when they are subjected to a tensile stress and how the resulting internal strains are absorbed to cause deformation of the tissue. In spite of the variability in  $\sigma$  values (Table 1), the stress-strain curves always presented a characteristic shape trend in all samples, although each one with its own distinctive rate of deformation until breaking point (BP) was reached (Figure 3). Curves of this figure displayed several regions of deformation. The SM (Figure 3) showed or elastic stress limit (EL) of 16.77 N cm<sup>-2</sup>, indicating that below this point, if the stress is removed, the tissue returns to its original shape (elastic region). The whole elastic region fits an s-shape, similar to that described for both the elastic behaviour of dry extruded collagen fibres (Zeugolis, Paul, & Attenburrow, 2008) and crystalline polymers (Kato, Christiansen, Hahn, Shieh, Goldstein, & Silver, 1989; Wang, Pins & Silver, 1994; Pins, & Silver, 1995). This region showed a small initial portion of sharply increasing stress up to a knee point, where the

gradient of the curve reduced, followed by a longer portion, where a constant rate of deformation can be assumed. In this region, the muscle extended its length perhaps by stretching and unfolding of the fibrillar structures (muscle fibres and connective tissue), which began to align along the strain axis. A similar shape of stress-strain curve has been associated with the arrangement of polymer chains with the stress (Purslow, Wess, & Hukins, 1998, Attenburrow, 1993, Zeugolis et al., 2008). Above the elastic stress limit, the SM was permanently deformed, and here the inelastic deformation of the muscle or plastic region begins. In this second region, a first step can be identified in which the stress increases again with increasing strain, up to a well defined knee point (24.32 N cm<sup>-2</sup> in Figure 3). After this knee point a new increase in the strain was observed as the stress increased until the ultimate tensile strength was reached and the muscle fractured (BP) (25.01 N cm<sup>-2</sup>, Figure 3). Of the three muscles studied, the SM was the one that absorbed the most energy in the inelastic deformations. This muscle was the most resistant, presenting the highest  $\sigma$  (Table 1). The length between EL and the point of inflection (knee points) of the stress-deformation curve is possibly due to the increasing extension and alignment, in the direction of the applied tension (stress), of the

collagen fibres of the connective tissue surrounding the bundles of muscle fibres (perimysium) and endomysial collagen. This would result in the disintegration of the muscle structure because of the reduced anchorage (or connections) between the muscle fibres and the connective tissue, and a subsequent sliding of the fibrillar structures over each other. The additional unfolding and extension of the muscle fibres could explain the progressive reduction in the slope of the stress-strain curve in the plastic region. The final shape of the stress-strain

curve (above the knee point) is probably due to small reductions in the cross-sectional area with a slight neck formation, probably caused by the progressive alignment of the fibres during straining as described in other biological structures (Purslow et al., 1998; Attenburrow, 1993). This behaviour suggests that rupture of the muscle would take place along several lines of weakness in the bundles of muscle fibres, by successive microfractures in the muscle fibres and in the destructure of intramuscular connective tissue.



**Figure 3.** Typical stress-strain curves for tensile testing of subcutaneous fat (a), *semimembranosus* (b), *semitendinosus* (c) and *biceps femoris* (d) from dry-cured ham  
EL: elastic stress limit; BP: breaking point

The elastic stress limit (EL) for BF was observed  $8.87 \text{ N cm}^{-2}$  (Figure 3). The stress-strain curve for this muscle in the elastic region (up to EL) was adjusted to a j-shape showing an initial long toe region related to low stress and high strain. Similar shapes of the stress-strain curve have been described in the elastic regions for many materials including soft tissues and biological materials (Atkins & Mai, 1985; Silver, 1987; Chen Guo, & Mi, 1994; Veronda & Westman, 1970; Christensen et al., 2003). The curve period of low resistance to deformation (toe period) could correspond to the

gradual stretch and unfolding in fibrillar structures (muscle fibres and connective tissue). At the higher stresses applied, once the structures have straightened out (heel area), the fibrillar structures could begin to align themselves along the strain axis (exponential period). In this muscle, the noticeable exponential stress-strain relationship in the elastic region suggests a strengthening by deformation. A similar strain hardening effect has also been observed in the elasticity measurements of several tissues such as anterior cruciate ligaments, psoas major tendon, pericardium, the aorta and in general,

arterial walls and skin, where the collagen fibres act as the stiffer fibres (Silver, 1987; Fratzl, Misof, & Zizak, 1997; García Paez et al., 2003). In general, this behaviour has been described in materials that contain fibres in a relatively soft matrix, such as meat structure, containing muscle fibre with myofibrillar proteins and a connective tissue network. Initially, the stress only acts against the soft matrix, but with time the fibres themselves align in the direction of the stress, so further pulling works against the stiffer fibres (Purslow et al., 1998; Attenburrow, 1993).

In the plastic region (above EL), the stress-strain curve for BF showed a short portion in which the stress increased again with increasing strain, associated with a new strain hardening effect, to reach a knee points. Above this point (around  $9.66 \text{ N cm}^{-2}$ ), an increase in stress was again observed coinciding with an increased deformation. At the end of the stress-strain curve an increased deformation was observed without an increase in stress (forming a small plateau) before the sample ruptured ( $> 9.5 \text{ N cm}^{-2}$ ). This last behaviour could be associated (Hull & Clyne, 1996) with the successive reductions in the cross-sectional area with necking (onset of necking) where the local cross-sectional area decreased more quickly than the rest of the sample. In contrast to the SM, the shape of the last portion of the stress-strain curve (with successive reductions in cross-sectional area) suggests that this muscle broke when the neck became unstable. Similarly, as also occurs in other biomaterials (Zeugolis et al., 2008), the breaking point is probably reached because the alignment of the fibres (sarcomere and collagens) along the strain axis reached a level at which they behave like a stiff spring, and when the stress exceeds a limit, the myofibrillar structures and the collagen fibres break.

The ST was the softest and weakest of the three muscles studied. The elastic region of the stress-strain curves for this muscle exhibited a slight j-shape, with a greater stress-strain relationship (high stress-low strain) and a shorter toe region than the curves for BF. Similar shaped curves have been reported for several biological materials (Zeugolis et al., 2008) and for split fibres of rabbit *semitendinosus* muscle (Wang, McCarter, Wright, Beverly, & Ramirez-Mitchell, 1991). The elastic stress limit (EL) for this muscle ( $6.09 \text{ N cm}^{-2}$  in figure 3) was the lowest and the plastic region was the shortest because, above the EL, the  $\sigma$  was reached after a small increase in stress. As described for BF, in this muscle there would also take place a successive extension and alignment along the strain axis of the fibrillar structures, but the rupture probably occurs with a smaller stress owing to the previous loss in anchorage of the connective tissue

that surrounds the muscle fibres, which is facilitated by the intramuscular fat deposited within the muscle in the loose network of perimysial connective tissue between the muscle bundles. Several authors (Kim et al., 2008) have reported on the fat contents of ham muscles, describing the highest contents for ST followed by BF and the lowest for SM, and the reverse for the protein content.

Variations in  $\sigma$  between muscle samples, and the differences in the shapes of the stress-strain curves could be attributed to several factors such as the morphology characteristic, type and proportion of muscle fibres (Maltin, Balcerzak, Tilley, & Delbay, 2003; Geay, Bauchart, Hocquette, & Culioli, 2001; Gil et al., 2001; Bee, Solomon, Czerwinski, Long, & Pursel, 1999), sarcomere length (Barker, Mies, Turner, Lunt, & Smith, 1995; Dransfield, 1977; Serra et al., 2005), intramuscular fat content (Koohmaraie, 1994; Fernández et al., 1999) and the type and amount of connective tissue (Campo et al., 2000; Dransfield, 1977; Koohmaraie, 1994, Serra et al., 2005). In this study, the effects of drying and curing in the ham production process must be added to these factors, depending on the depth of the muscle in the meat piece. The results obtained here suggest that dehydration has a marked effect on the mechanical properties of the muscle of the dry cured ham. BF and ST were more stretchy than SM and both presented j-shaped stress-strain curves probably because these muscles (BF and ST) were deformed to large strains with little stress. ST is located in a deeper layer of the ham and although BF is more external than ST, it is surrounded on the outside by a thick layer of fat, which reduces its water loss (DM around  $45.7 \text{ g/100 g product}$ ). However, SM exhibited stress-strain curves with an s-shape in the elastic region, a steeper slope and the highest breaking points. This behaviour indicates the stiff and tough character of this muscle from dry-cured ham, which could be associated with the increased dehydration of its components (myofibrillar and connective tissue) because SM occupies more external positions and would therefore be subject to the greatest degrees of dehydration (DM around  $57.7 \text{ g/100 g product}$ ). These results seem to agree with the mechanical behaviour of extruded collagen fibres in the dry and wet state. These fibres showed typical s- and j-shaped stress-strain curves in the dry and wet states, respectively (Zeugolis et al., 2008). It has also been observed that rehydration of the fibres resulted in increased weakness (Zeugolis et al., 2008).

On the other hand, one would expect the salting during ham processing, and the resulting concentration of salt in the muscles to change its



mechanical behaviour. In fact, it is known that both the slope in the elastic region of the stress-strain curve and the  $\sigma$  of collagen fibrils increase with the amount of mineral deposited (Jäger & Fratzl, 2000; Landis et al. 1995). Several authors reported for dry-cured ham that hardness increases with salt content (Andrés, Cava, Ventanas, Thovar, & Ruiz, 2004; Ruiz-Ramírez, Arnau, Serra, & Gou, 2005). It is likely that the steep slope in the elastic region of the stress-strain curve for SM is associated with the increased stiffness of the fibrillar structures of the muscle (myofibrillar and connective tissue) by the NaCl effect. However, this effect was less apparent in the BF, probably due to the increased proteolytic activity of this muscle (Virgili et al., 1995; Parolari et al., 1994; García-Garrido, Quiles-Zafra, Tapiador, & Luque de Castro, 2000; Rico, Toldrá & Flores, 1991; Toldrá, Rico, & Flores, 1992). In this regard, Huff-Lonergan (2005) suggests that degradation of key cytoskeletal proteins by calpain proteinases has a role to play in determining water-holding capacity. However, limited degradation of cytoskeletal proteins may result in increased shrinkage of the overall muscle cell (Huff-Lonergan, 2005). Presumably, the mechanical behaviour of the different muscles is closely associated with the level of breakdown of the cytoskeletal proteins by postmortem proteolysis. In fact, Christensen et al., (2003) observed that the  $\mu$ -calpain is capable of mechanically weakening the single muscle fibres.

It has been reported that, within the physiological range of muscle length change, myofibrillar structures are the major source of elasticity and the sarcolemma and extracellular connective tissues only begin to contribute significantly in highly extended muscles (Magid & Law, 1985; Higuchi & Umazume, 1985; Wang et al., 1991). Although in a different way, in the post-rigor muscle the sarcomere characteristics and the intramuscular connective tissue maintain an important role in the mechanical response of each tissue. SM showed the lowest intramuscular fat (Candek-Potokar, Monin, & Zlender, 2002; Maddock, Bidner, Carr, McKeith, Berg, & Savell, 2002), lowest collagen content, and longest sarcomere length (Wheeler et al., 2000) with respect to BF and ST. These characteristics could be related to the greater amount of energy required to cause deforming and fracturing observed in this muscle (Figure 3).

In relation with BF, it has been reported that this muscle, in comparison to SM and ST, presents the smallest sarcomere length and the highest collagen content (Wheeler et al., 2000). Supposedly, the exponential strain hardening showed by BF and the greater neck formation (necking) with small successive strain hardenings in the final portion of the stress-strain curves of this muscle are associated

with these characteristics, especially with its collagen content. Oshima et al. (2009) showed that the variation in muscle collagen content is due to the variation in the state of development of perimysium which is composed of an organised network of collagen forms together with elastic fibres (Rowe, 1986).

Similarly to descriptions given in other tissues (Sanjeevi, Somanathan, & Ramaswamy, 1982; Haut, 1983; Ankerson, Birkbeck, Thomson, & Vanezis, 1999; Shergold, Fleck, & King, 2006), the behaviour of BF could be partly attributed to the capacity of the network of collagen fibres to straighten and align in the direction of the applied strain (Millington & Wilkinson, 1983; Finlay, 1969). In studies carried out in the skin in which j-shaped stress-strain curves very similar to those obtained with BF were observed, it was found that at low strains the constitutive response of tissue is dominated by the bending stiffness of the collagen fibres (Shergold et al., 2006), whilst at high strains the constitutive response of tissue is dominated by the tensile elastic response of the collagen fibres.

As mentioned previously, ST exhibited a similar stretchy mechanical behaviour to BF although with less toughness, probably due to its greater intramuscular fat content (Kim et al., 2008). Several authors (Ruiz-Carrascal, Ventanas, Cava, Andrés, & García, 2000) have reported that the intramuscular fat content of dry-cured ham exhibited a negative relationship with hardness.

The uniaxial tensile tests revealed a j-shaped stress-strain curve for the SF (Figure 3), with a long initial portion showing a high stress associated with a low strain. The end of this step is considered to correspond to the elastic stress limit (around 17 N cm<sup>-2</sup>). Above this limit the SF ruptured after an inelastic cut or a plastic deformation, without any noticeable prior change in the rate of deformation and necking by cross-line section reduction. This tissue displayed a  $\sigma$  greater than those for BF and ST and similar to SM. The SF is largely composed of fat cells (adipocytes) separated by a network of connective tissue fibre, predominantly the collagen fibres and small quantities of elastic and reticular fibres (Sumena, Lucy, Chungath, Ashok, & Harshan 2010). The relatively high  $\sigma$  of SF samples and the shape of the stress-strain curve could be related to the presence of this connective tissue. Dry-cured hams from Teruel are elaborated from pigs slaughtered at 8-9 months of age and a high weight (live weight between 110-130 kg). It is known that the increase in cross-linking, associated with an expansion of dense connective tissue, and the insolubility of collagen increase with animal age (Gerrard & Grant, 2003; Fang, Nishimura, & Takahashi, 1999) affecting the toughness of the

muscles and also possibly the SF tissue of which they form a part. In this tissue it is possible that there may be different degrees of strains between the collagen fibre bundles and as the fibrous network is extended, more and more fibres become taut and the stress increases (Attenburrow, 1993) until a stress is reached at which this finally fails by a process of defibrillation (Pins, Christiansen, Patel, & Silver, 1997; Kato & Silver, 1990; Sasaki, & Odajima, 1996), then the fat cells would be separated without requiring greater stress and the SF tissue would break.

Gordon (1968) suggested that material exhibiting j-shaped stress-strain curves resisted cracks better than linear elastic materials and used this idea to explain the unusual breaking resistance of biological materials such as skin, artery or gut. However, Kendall and Fuller (1987) reported that no general statement can be made about the effect of the shape of the stress-strain curve upon the breaking resistance of materials. In different circumstances, these authors found that materials exhibiting an elastic region with a j-shaped curve broke at lower stress than those with other shaped stress-strain curves (Kendall & Fuller, 1987).

#### 4. Conclusions

The tensile test can give important information about the mechanical behaviour of dry cured ham such as breaking strength ( $\sigma$ ). These data can help to improve the introduction of the meat product on the market, for example to consider the probability of rupture of the sliced meat product.

The variation in  $\sigma$  in the tensile testing of different tissues of dry-cured ham can be modelled using the Weibull distribution, which can predict the fracture probability of each tissue at different tensile loads. *Semimembranosus* (SM) muscle was the most resistant and also the most reliable in tensile testing. For rupture of this muscle, with a 63% probability, 26 N cm<sup>-2</sup> were required, whereas half this force (12.19 N cm<sup>-2</sup>) was sufficient to rupture *semitendinosus* (ST) muscle with the same probability. Subcutaneous fat showed a similar reliability to SM. However, ST presented the largest Weibull module, indicating a greater homogeneity in the experimental values of  $\sigma$ .

When a tensile stress was applied the resulting internal strains were absorbed causing a characteristic deformation in each tissue and typical stress-strain curves were obtained. The form of the stress-strain curves for each tissue can be related to several factors such as morphology characteristics, sarcomere length, intramuscular fat and connective contents and proteolytic activity. Depending on the position of the tissue in the meat, the processing of

ham (salting and drying) can also determine the form of stress-strain curves obtained.

Finally, because of the great variability in  $\sigma$  of the different ham tissues the validity of data taken as simple averages of experimental results would come into question. The Weibull distribution was used here to model a strength property of a Spanish dry-cured ham, but could also be used for other meat products in areas with similar uncertainties to that described in this study.

#### Acknowledgements

The present work received financial support from projects AGL2010-19158 and CSD 2007-00016 (CONSOLIDER INGENIO 2010) funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation.

#### References

- Andrés, A., Cava, R., Ventanas, J., Thovar, V., & Ruiz, J. (2004). Sensory characteristics of Iberian ham: Influence of salt content and processing conditions. *Meat Science*, 68, 45–51.
- Ankerson, J., Birkbeck, A. E., Thomson, R. D., & Vanezis, P. (1999). Puncture resistance and tensile strength of skin simulants. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, 213, 493–501.
- Arnau, J., Guerrero, L., Casademont G., & Gou, P. (1995). Physical and chemical changes in different zones of normal and PSE dry cured ham during processing. *Food Chemistry*, 52, 63–69.
- Association of Official Analytical Chemists. (1995). Salt (Chlorine as Sodium Chloride) in Meat. 935.47. *Official methods of analysis* (15th edition). Gaithersburg. Maryland.
- Association of Official Analytical Chemists. (2006). *Association of Official Analytical Chemists*, (18th ed.). Washington DC.
- Atkins, A. G. & Mai, Y. W. (1985). *Elastic and plastic fracture: Metals, polymers, ceramics, composites, biological materials*. Ellis Horwood, London, UK.
- Attenburrow, G. E. (1993). The rheology of leather – a review. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 77, 107–114.
- Barker, B. P., Mies, W. L., Turner, J. W. Lunt, D. K. & Smith, S. B. (1995). Influence of production system on carcass characteristics of F1 Wagyu x Angus steers and heifers. *Meat Science*, 41, 1–5.
- Bee, G., Solomon, M.B., Czerwinski, S.M., Long, C, Pursel, V.G. (1999). Correlation between histochemically assessed fiber type distribution and isomyosin and myosin heavy chain content in porcine skeletal muscles. *Journal Animal Science*, 77, 2104–2111.
- Borrero-López, O., Hoffman, M., Bendavid, A., & Matin, P. J. (2009). Reverse size effect in the fracture strength of brittle thin films. *Scripta Materialia*, 60, 937–940.
- Bourne, M. C. (1978). Texture profile analysis. *Food Technology*, 32, 62–66.
- Bourne, M. C. (2002). Principles of objective texture measurement. In M. C. Bourne (Ed.), *Food texture and viscosity: Concept and measurement* (pp. 107–188). San Diego, USA.
- Bruna, J. M., Fernández, M., Hierro, E. M., Ordóñez, J. A., & de la Hoz, L. (2000). Combined use of pronase E and a fungal extract (*Penicillium aurantiogriseum*) to potentiate the sensory characteristics of dry fermented sausages. *Meat Science*, 54, 135–145.

- Campo, M. M., Santolaria, P., Sañudo, C., Lepetit, J., Olleta, J. L., Panea, B. Albertí, P. (2000). Assessment of breed type and ageing time effects on beef meat quality using two different texture devices. *Meat Science*, 55, 371-378.
- Candek-Potokar, M., Monin, G., & Zlender, B. (2002). Pork quality, processing and sensory characteristics of dry-cured hams as influenced by Duroc crossing and sex. *Journal of Animal Science*, 80, 988-996.
- Chen, X. Guo, Q. & Mi, Y. (1998). Bamboo fiber-reinforced polypropylene composites: A study of the mechanical properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 69, 1891-1899.
- Christensen, M., Purslow, P. P., & Larsen, L. M. (2000). The effect of cooking temperature on mechanical properties of whole meat, single muscle fibres and perimysial connective tissue. *Meat Science*, 55, 301-307.
- Christensen, M., Young, R. D., Lawson, M. A., Larsen, L. M., & Purslow, P. P. (2003). Effect of added  $\mu$ -calpain and post-mortem storage on the mechanical properties of bovine single muscle fibres extended to fracture. *Meat Science*, 66, 105-112.
- Davies, D. G. S. (1973). The statistical approach to engineering design in ceramics. *Proceedings of the Britain Ceramic Society*, 22, 429-452.
- Dransfield, E. (1977). Intramuscular composition and texture of beef muscles *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28, 833-842.
- Dirikolu, M. H., Aktaş, A. & Birgören, B. (2002). Statistical Analysis of Fracture Strength of Composite Materials Using Weibull Distribution. *Turkish Journal Engineering and Environmental Science*, 26, 45-48.
- Dodson, B. (1994). *Weibull Analysis*, American Society for Quality.
- European Commission. (1996). Commission Regulation (EC) No. 1107/96 of 12 June 1996 on the registration of geographical indications and designations of origin under the procedure laid down in Article 17 of Council Regulation (EEC) No. 2081/92. *Official Journal of the European Communities*, L148, 1-15.
- European Commission. (1999). Commission Regulation (EC) No. 2419/1999 of 12 November 1999 supplementing the Annex to Regulation (EC) No. 2301/97 on the entry of certain names in the Register of certificates of specific character provided for in Council Regulation (EEC) No. 2082/92 on certificates of specific character for agricultural products and foodstuffs. *Official Journal of the European Communities*, L291, 25-26.
- European Commission (2006). Council Regulation (EC) No 510/2006 of 20 March 2006 on the protection of geographical indications and designations of origin for agricultural products and foodstuffs. *Official Journal of European Union of 31.3.2006*, L93, 12-25.
- Fang, S. H., Nishimura, T. & Takahashi, K. (1999). Relationship between development of intramuscular connective tissue and toughness of pork during growth of pigs. *Journal of Animal Science*, 77, 120-130.
- Fantazzini, P., Gombia, M., Schembri, P., Simoncini, N., & Virgili, R., (2009). Use of Magnetic Resonance Imaging for monitoring Parma dry-cured ham processing. *Meat Science*, 82, 219-227.
- Fernández, M., Ordóñez, J. A., Cambero, I., Santos, C., Pin, C. & Hoz, L. (2007). Fatty acid compositions of selected varieties of Spanish dry ham related to their nutritional implications. *Food Chemistry*, 101, 107-112.
- Fernández, X., Monin, G., Talmant, A., Mourot, J., & Lebret, L. (1999). Influence of intramuscular fat content on the quality of pig meat — 1. Composition of the lipid fraction and sensory characteristics of *m. longissimus lumborum*. *Meat Science*, 53, 59-65.
- Finlay, B. (1969). Scanning electron microscopy of the human dermis under uni-axial strain. *Biomedical engineering*, 4, 322-327.
- Foegeding, E. A., Brown, J., Drake, M. A., Daubert, C. R. (2003). Review. Sensory and mechanical aspects of cheese texture. *International Dairy Journal*, 13, 585-591.
- Foschi, R. O. & Barrett, J. D. 1975. Longitudinal shear strength of Douglas-fir. *Canadian Journal of Civil Engineering*, 3, 198-208.
- Fox, J. B. (1980). Diffusion of chloride, nitrite and nitrate in beef and pork. *Journal of Food Science*, 45, 1740-1744.
- Fratzl, P., Misof, K., & Zizak, I. (1997). Fibrillar Structure and Mechanical Properties of Collagen. *Journal of Structural Biology*, 122, 119-122.
- García-Garrido, J. A., Quiles-Zafra, R., Tapiador, J., & Luque de Castro, M. D. (2000). Activity of cathepsin B, D, H and L in Spanish dry-cured ham of normal and defective texture. *Meat Science*, 56, 1-6.
- García Paez, J. M., Jorge Herrero, E., Carrera Sanmartin, A., Millan, I., Cordon, A., Martin Maestro, M., Rocha, A., Arenaz, B., & Castillo-Olivares, J. L. (2003). Comparison of the mechanical behaviors of biological tissues subjected to uniaxial tensile testing: pig, calf and ostrich pericardium sutured with Gore-Tex. *Biomaterials*, 24, 1671-1679.
- Geay, Y., Bauchart, D., Hocquette, J. F., & Culioli, J. (2001). Effect of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. *Reproduction Nutrition Development*, 41, 1-26.
- Ghosh, A., (1999). A FORTRAN Program for Fitting Weibull Distribution and Generating Samples. *Computers and Geosciences*, 25, 729-738.
- Gordon, J. E. (1968). *Structures: Or Why Things Don't Fall Down*. (London: Penguin).
- Gou, P., Comaposada, J., & Arnau, J. (2004) Moisture diffusivity in the lean tissue of dry-cured ham at different process times. *Meat Science*, 67, 203-209.
- Haut, R. C. (1983). Age-dependent influence of strain rate on the tensile failure of rat-tail tendon. *Journal Biomechanical Engineering*, 105, 296-9.
- Herrero, A. M., Ordóñez, J. A., Romero de Ávila, M. D., Herranz, B., de la Hoz, L., & Cambero, M. I. (2007). Breaking strength of dry fermented sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) and physico-chemical characteristics. *Meat Science*, 77, 331-338.
- Herrero, A. M., de la Hoz, L., Ordóñez, J. A., Herranz, B., Romero de Ávila, M. D., & Cambero, M. I. (2008). Tensile properties of cooked meat sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) parameters and physicochemical characteristics. *Meat Science*, 80, 690-696.
- Higuchi, H. & Umazume, Y. (1985). Localization of the parallel elastic components in frog skinned muscle fibers studied by the dissociation of the A- and I-bands. *Biophysical Journal*, 48, 137-147.
- Honikel, K. O. (1998). Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat Science*, 49, 447-457.
- Houben, J. H., & van't Hooft, B. J. (2005). Variations in product-related parameters during standardised manufacture of a semi-dry fermented sausage. *Meat Science*, 69, 283-287.
- Hoz, L., D'Arrigo, M., Cambero, I., & Ordóñez, J. A. (2004). Development of an n-3 fatty acid and  $\alpha$ -tocopherol enriched dry fermented sausage. *Meat Science*, 67, 485-495.
- Hoz, L., Cambero, M. I., Cabeza, M. C., Herrero, A. M., & Ordóñez, J. A. (2008). Elimination of *Listeria monocytogenes* from vacuum-packed dry-cured ham by E-beam irradiation. *Journal of Food Protection*, 71, 2001-2006.
- Huff-Lonergan, E., & Lonergan, S. M. (2005). Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Science*, 71, 194-204.

- Hull, D. & Clyne, T. W. (1996). *An Introduction to Composite Materials*, Cambridge University Press.
- Jäger, I. & Fratz, P. (2000). Mineralized Collagen Fibrils: A Mechanical Model with a Staggered Arrangement of Mineral Particles. *Biophysical Journal*, 79, 1737–1746.
- Johnson, R. A., & Haskell, J. H. (1983). Sampling properties of estimators of a Weibull distribution of use in the lumber industry. *Canadian Journal of Statistics*, 11, 155–169.
- Kato, Y. P., Christiansen, D. L., Hahn, R. A., Shieh, S.-J., Goldstein, J. D., & Silver, F. H. (1989). Mechanical properties of collagen fibres: a comparison of reconstituted and rat tail tendon fibres. *Biomaterials*, 10, 38–42.
- Kato, Y. P., & Silver, F. H. (1990). Formation of continuous collagen fibres: evaluation of biocompatibility and mechanical properties. *Biomaterials*, 11, 169–175.
- Kendall, K., & Fuller, K. N. G. (1987). J-shaped stress/strain curves and crack resistance of biological materials. *Journal Physics, D: Applied Physics*, 20, 1596–1600.
- Kilcast, D. (2004). Force/deformation techniques for measuring texture. In D. Kilcast (Ed.). *Texture in food* (Vol. 2, pp. 109–145). Abington, Cambridge UK: Woodhead Publishing Ltd.
- Kim, J. H., Seong, P. N., Cho, S. H., Park, B. Y., Hah, K. H., Yu, L. H., Lim, D. G., Hwang, I. H., Kim, D. H., Lee, J. L., & Ahn, C. N. (2008). Characterization of nutritional value for twenty-one pork muscles. *Asian-australas. Journal Animal Science*, 21, 138–144.
- Klein, C. A. (2009). Characteristic strength, Weibull modulus, and failure probability of fused silica glass. *Optical Engineering*, 48, 113401/1–113401/10.
- Koohmaraie, M. (1994). Muscle proteinases and meat ageing. *Meat Science*, 36, 93–104.
- Kristensen, L., Purslow, P. P. (2001). The effect of ageing on the water-holding capacity of pork: role of cytoskeletal proteins. *Meat Science*, 58, 17–23.
- Landis, W. J., Librizzi, J. J., Dunn, M. G., & Silver, F. H. (1995). A study of the relationship between mineral content and mechanical properties of turkey gastrocnemius tendon. *Journal of Bone and Mineral Research*, 10, 859–867.
- Lawn, B. R. 1993. *Fracture of Brittle Solids*, 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Lawless, H. T., & Heymann, H. (1998). *Texture evaluation*. In Sensory evaluation of food. New York, NY: Chapman & Hall.
- Lepetit, J., & Culioli, J. (1994). Mechanical properties of meat. *Meat Science*, 36, 203–237.
- Lewis, G. J., & Purslow, P. P. (1989). The strength and stiffness of perimysial connective tissue isolated from cooked beef muscle. *Meat Science*, 26, 255–269.
- Maddock, R. J., Bidner, B. S., Carr, S. N., McKeith, F. K., Berg, E. P., & Savell, J. W. (2002). Creatine monohydrate supplementation and the quality of fresh pork in normal and halothane carrier pigs. *Journal of Animal Science*, 80, 997–1004.
- Magid, A. & Law, D. J. (1985) Myofibrils Bear Most of the resting tension In Frog Skeletal Muscle. *Science*, 230, 1280–1282.
- Maltin, C., Balcerzak, D., Tilley, R. & Delday, M. (2003). Determinants of meat quality: tenderness. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62, 337–347.
- MARM. (2009). Datos de las Denominaciones de Origen Protegidas (D.O.P.) e indicaciones Geográficas Protegidas (I.G.P.) de Productos Agroalimentarios ([http://www.marm.es/es/alimentación/temas/calidad-agroalimentaria/INFORME\\_FINAL\\_VINCULADO\\_A\\_EXCEL\\_2009\\_tcm7-152858.pdf](http://www.marm.es/es/alimentación/temas/calidad-agroalimentaria/INFORME_FINAL_VINCULADO_A_EXCEL_2009_tcm7-152858.pdf)).
- Martín, V. (2010). Consumo de jamón en España. Distribución y Consumo, 110. (<http://www.marm.es>).
- Martín-Bejarano, S. (2001). Elaboración del jamón curado de cerdo blanco. In S. Martín-Bejarano (Ed.). *Enciclopedia de la carne y de los productos cárnicos* (Vol. 2, pp. 1205–1219). Plasencia: Martín & Macías.
- McLaughlin, N. B. (1987). Statistical Models For Failure Of Apple Tissue Under Constant-Strain-Rate Loading. *Journal of Texture Studies*, 18, 173–186.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). (1993). Orden de 3 de noviembre de 1993 por la que se ratifica el Reglamento de la Denominación de Origen “Jamón de Teruel” y su Consejo Regulador. *Boletín Oficial del Estado*, 286, 33977.
- Millington, P. F., & Wilkinson, R. (1983). *Skin: biological structure and function*, 1st ed. Cambridge: Cambridge University Press.
- Mutungi, G., Purslow, P. P., & Warkup, C. (1995). Structural and mechanical changes in raw and cooked single porcine muscle fibres extended to fracture. *Meat Science*, 40, 217–234.
- Mutungi, G., Purslow, P. P., & Warkup, C. (1996). Influence of temperature, fibre diameter and conditioning on the mechanical properties of single muscle fibres extended to fracture. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 72, 359–366.
- Ockerman, H. W., Basu, L., León Crespo, F., & Céspedes, J. (2002). *Comparison of European and American systems of production and consumption of dry-cured hams*. Des Moines: National Pork Board. American Meat Science Association, pp. 1–12.
- Oshima, I., Iwamoto, H., Nakamura, Y.N., Takayama, K., Ono, Y., Murakami, T., Shiba, N., Tabata, S., & Nishimura, S. (2009). Comparative study of the histochemical properties, collagen content and architecture of the skeletal muscles of wild boar crossbred pigs and commercial hybrid pigs. *Meat Science*, 81, 382–390.
- Parolari, G., Virgili, R., & Schivazappa, C. (1994). Relationship between cathepsin B activity and compositional parameters in dry-cured hams of normal and defective texture. *Meat Science*, 38, 117–122.
- Pins, G. D., & Silver, F. H. (1995). A self-assembled collagen scaffold suitable for use in soft and hard tissue replacement. *Materials Science and Engineering: C*, 3, 101–107.
- Pins, G. D., Christiansen, D. L., Patel, R., & Silver, F. H. (1997). Self-assembly of collagen fibers. Influence of fibrillar alignment and decorin on mechanical properties. *Biophysical Journal*, 73, 2164–2172.
- Purslow, P. (1985). The physical basis of meat texture: observations on the fracture behaviour of cooked bovine M. *Semitendinosus*. *Meat Science*, 12, 39–60.
- Purslow, P. P., Wess, T. J., & Hukins, D. W. L. (1998). Collagen orientation and molecular spacing during creep and stress-relaxation in soft connective tissues. *Journal of Experimental Biology*, 201, 135–142.
- Rico, E., Toldrá, F., & Flores, J. (1991). Effect of dry-curing process parameters on pork muscle cathepsins B, H and L activities. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 193, 541–544.
- Rowe, R. W. (1986). Elastin in bovine semitendinosus and longissimus dorsi muscles. *Meat Science*, 17, 293–312.
- Ruiz-Carrascal, J., Ventanas, J., Cava, R., Andrés, A. I., García C. (2000) Texture and appearance of dry cured ham as affected by fat content and fatty acid composition. *Food Research International*, 33, 91–95.
- Ruiz-Ramírez, J., Arnau, J., Serra, X. & Gou, P. 2005. Relationship between water content, NaCl content, pH and texture parameters in dry-cured muscles. *Meat Science*, 70, 579–587.
- Sanjeevi, R., Somanathan, N., & Ramaswamy, D. (1982). A viscoelastic model for collagen fibres. *Journal Biomechanics*, 15, 181–3.
- Scanlon, M. G. & Long, A. E. (1995). Fracture strengths of potato tissue under compression and tension at two rates of loading. *Food Research International*, 28, 397–402.

- Santos, C., Hoz, L., Cambero, I., Cabeza, C. y Ordóñez, J.A. (2008). Enrichment of dry-cured ham with  $\alpha$ -linolenic acid and  $\alpha$ -tocopherol by the use of linseed oil and  $\alpha$ -tocopheryl acetate in pig diets. *Meat Science*, 80, 668-674.
- Sasaki, N. & Odajima, S. (1996). Elongation mechanism of collagen fibrils and force-strain relations of tendon at each level of structural hierarchy. *Journal Biomechanics*, 29, 1131-1136.
- Scott-Blair, G. W. (1958). Rheology in food research. *Advances in Food Research*, 8, 1-61.
- Serra, X., Ruiz-Ramírez, J., Arnau, J. & Gou, P. 2005. Texture parameters of dry-cured ham m. biceps femoris samples dried at different levels as a function of water activity and water content. *Meat Science*, 69, 249-254.
- Shergold, O. A., Fleck, N. A., & King, T. S. (2006). The penetration of a soft solid by a liquid jet, with application to the administration of a needle-free injection. *Journal of Biomechanics*, 39, 2593-2602.
- Silver, F. (1987). *Biological Materials: Structure Mechanical Properties and Modeling of Soft Tissues*, New York University Press, New York.
- Sullivan, J. D. & Lauzon, P. H. (1986). Experimental probability estimators for Weibull plots. *Journal of Materials Science Letters*, 5, 1245-1247.
- Sumena, K. B., Lucy, K. M., Chungath, J. J., Ashok, N., & Harshan, K. R. (2010). Regional histology of the subcutaneous tissue and the Sweat glands of large white yorkshire pigs. *Tamilnadu Journal Veterinary & Animal Sciences*, 6, 128-135.
- Toldrá, F., Rico, E., & Flores, J. (1992). Activities of pork muscle proteases in model cured meat systems. *Biochimie*, 74, 291-296.
- Trustum, K. & Jayatilaka, S. (1979). On estimating the Weibull modulus for brittle material. *Journal of Materials Science*, 14, 1080-1084.
- Ventanas, J., Ruiz, J., & Córdoba, J. J. (2001). El jamón curado de cerdo ibérico: descripción del proceso tradicional de elaboración. In S. Martín-Bejarano (Ed.). *Enciclopedia de la carne y de los productos cárnicos* (Vol. 2, pp. 1221-1245). Plasencia: Martín & Macías.
- Veronda, D. R. & Westman, R. A. (1970). Mechanical characterisation of skin: finite deformations. *Journal of Biomechanics*, 3, 111-24.
- Virgili, R., Parolari, G., Schivazappa, C., Soresi-Bordini, C., & Born, M. (1995). Sensory and texture quality of dry-cured ham as affected by endogenous cathepsin B activity and muscle composition. *Journal of Food Science*, 60, 1183-1186.
- Visessanguan, W., Soottawat, B., Riebroy, S., & Thepkasikul, P. (2004). Changes in composition and functional properties of proteins and their contributions to Nham characteristics. *Meat Science*, 66, 579-588.
- Wachtman, J. B. (1996). *Mechanical Behaviour of Ceramics*. John Wiley & Sons Inc, New York, USA.
- Wang, K., McCarter, R., Wright, J., Beverly, J., & Ramirez-Mitchell, R. (1991). Regulation of skeletal muscle stiffness and elasticity by titin isoforms: A test of the segmental extension model of resting tension. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 7101-7105.
- Wang, M. C., Pins, G. D., & Silver, F. H. (1994). Collagen fibres with improved strength for the repair of soft tissue injuries. *Biomaterials*, 15, 507-512.
- Weibull, W. (1959). *A Statistical Theory of Strength of Materials*, Royal Swedish Institute for Engineering Research, Stockholm.
- Wheeler, T. L., Shackelford, S. D., & Koohmaraie, M. (2000). Variation in proteolysis, sarcomere length, collagen content, and tenderness among major pork muscles, *Journal of Animal Science*, 78, 958-965.
- Willems, M. E. T., & Purslow, P. P. (1996). Effect of post rigor sarcomere length on mechanical and structural characteristics of raw and heat denatured single porcine muscle fibres. *Journal of Texture Studies*, 27, 217-233.
- Zhao, Y., Ma, E., Xu, J. (2008). Reliability of compressive fracture strength of Mg-Zn-Ca bulk metallic glasses: Flaw sensitivity and Weibull statistics. *Scripta Materialia*, 58, 496-499.
- Zeugolis, D. I., Paul, R. G., & Attenburrow, G. (2008). Post-self-assembly experimentation on extruded collagen fibres for tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia*, 4, 1646-1656.

## ***CAPÍTULO 2.***

**ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS Y  
ESTRUCTURALES DE MIOSISTEMAS GELIFICADOS EN  
FRÍO POR AGENTES DERIVADOS DE PLASMA  
SANGUÍNEO (SISTEMA FIBRINÓGENO-TROMBINA Y  
PLASMA SANGUÍNEO DESHIDRATADO)**



### **Planteamiento del trabajo y objetivos**

*En esta etapa de la investigación se pretendió incrementar el conocimiento existente sobre los mecanismos de acción de los agentes de ligazón en frío derivados del plasma sanguíneo (sistema fibrinógeno-trombina y preparado de plasma sanguíneo deshidratado). Estos agentes han sido mucho menos estudiados que otros con aplicación industrial más extendida, como es la transglutaminasa de origen microbiano. Para ello se recurrió a sistemas modelo constituidos por emulsiones cárnicas con y sin adición de sal. Estos sistemas permitieron estudiar la estructura de los geles cárnicos resultantes de la adición de los agentes de ligazón. Puede asumirse que fenómenos similares se darían en la interfase entre superficies cárnicas ligadas en frío en la reestructuración de carnes con estos mismos agentes. Para el estudio se recurrió a la imagen de resonancia magnética (IRM) como una técnica no destructiva que aporta considerable información sobre la microestructura.*

*Los objetivos parciales afrontados en este capítulo fueron:*

- 1. Conocer las características estructurales de miosistemas tratados con agentes de ligazón en frío derivados del plasma sanguíneo.*
- 2. Estudiar la relación entre características reológicas y estructurales de miosistemas tratados con agentes de ligazón en frío derivados del plasma sanguíneo.*





## **CAPÍTULO 2. ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS Y ESTRUCTURALES DE MIOSISTEMAS GELIFICADOS EN FRÍO POR AGENTES DERIVADOS DE PLASMA SANGUÍNEO (SISTEMA FIBRINÓGENO-TROMBINA Y PLASMA SANGUÍNEO DESHIDRATADO)**

Los resultados de este capítulo se recogen en los siguientes artículos:

- **ARTÍCULO 2.1.** Magnetic Resonance Imaging, Rheological Properties, and Physicochemical Characteristics of Meat Systems with Fibrinogen and Thrombin
- **ARTÍCULO 2.2.** Magnetic resonance imaging study of the cold-set gelation of meat systems containing plasma powder



**ARTÍCULO 2.1.**

**Magnetic Resonance Imaging, Rheological Properties, and  
Physicochemical Characteristics of Meat Systems with  
Fibrinogen and Thrombin**

**Journal of Agricultural and Food Chemistry.**

**(2007). 55 (23), 9357 – 9364.**



## Magnetic Resonance Imaging, Rheological Properties, and Physicochemical Characteristics of Meat Systems with Fibrinogen and Thrombin

A. M. HERRERO,<sup>†</sup> M. I. CAMBERO,<sup>\*,§</sup> J. A. ORDÓÑEZ,<sup>§</sup> D. CASTEJÓN,<sup>#</sup>  
M. D. ROMERO DE AVILA,<sup>†</sup> AND L. DE LA HOZ<sup>†</sup>

Departamento Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Instituto de Ciencia y Tecnología de la Carne, Facultad de Veterinaria, and CAI de Resonancia Magnética Nuclear, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

Magnetic resonance imaging (MRI) and textural and physicochemical analyses were carried out to evaluate the effect of fibrinogen and thrombin (Fibrimex) addition to meat systems formulated with and without NaCl. For this purpose, different model systems were elaborated: fibrinogen and thrombin (FT), meat emulsion (ME), and meat emulsion with fibrinogen and thrombin (MEFT), with 0, 1, and 2% of NaCl. The addition of fibrinogen–thrombin to meat emulsions results in a gel network with modified physicochemical and textural characteristics, increasing the hardness and springiness. The addition of NaCl at 2% to FT and MEFT systems reduced the gel hardness. MRI parameters ( $T_2$ ,  $T_1$ , and apparent diffusion coefficient) indicated that systems with fibrinogen and thrombin (FT and MEFT) presented a structure with many and large pores, bulk water, and higher translational motion of water. Significant correlations were found between MRI, texture, and physicochemical parameters.

**KEYWORDS:** Meat systems; fibrinogen; thrombin; magnetic resonance imaging (MRI); texture

### INTRODUCTION

Traditionally, the elaboration of meat products depends on the hot-set binding of myofibrillar proteins extracted from meat by the combined effects of sodium chloride, phosphates, and mechanical actions (1–4). Moreover, there is a demand for healthy meat products elaborated without adding phosphate and with reduced salt content, because a high salt content has been related to cardiovascular disease and excessive dietary phosphate can increase the risk of bone diseases (5, 6). An alternative to hot-set binding systems to elaborate meat products is to use cold-set binders. Several cold-set binding systems (alginate–calcium, transglutaminase of different origins, fibrinogen, and thrombin) have been developed to produce meat products that can be used in the chilled and raw state, reducing or eliminating the need to add sodium chloride and phosphates (7–12). A cold-set binding agent that has given good results for meat product formulation is the combination of fibrinogen and thrombin (fibrinogen–thrombin). It is possible to obtain fibrinogen and thrombin from porcine or bovine blood plasma. Fibrinogen is an elongated protein and is made up of globular domains at

each end connected by  $\alpha$ -helical coiled coils to a globular region in the middle. Thrombin converts soluble fibrinogen to insoluble fibrin polymer by cleaving fibrin peptides from the central domain, exposing knobs that can then interact with holes that are always exposed at the ends of the molecule, giving rise to a half-staggered structure called the protofibril. When the protofibrils grow long enough, they aggregate laterally to form fibers, which then branch to yield a three-dimensional network fibrin clot or stable fibrin gel (13–17). It is known that the variation of fibrin parameters, such as fibrinogen concentration, thrombin concentration, and ionic strength, generates gels with different appearances, mechanical properties, and stabilities (13, 15). Frozen independent solutions of fibrinogen and thrombin are commercialized as Fibrimex (FNA Foods, Harimex Inc.) to be mixed just before use, for the elaboration of meat products. Fibrimex has been used to manufacture several restructured meat products (10–12). The effects of Fibrimex addition on consumer acceptance and textural properties of restructured meat products (10–12) have been studied. However, structural information relating to aspects of how the fibrinogen and thrombin affect the components (proteins, water, etc.) of the finished product is required to increase the use of this cold-set binding agent.

In this respect, magnetic resonance imaging (MRI) is a noninvasive and nondestructive technique that provides structural information of biological tissue. The use of MRI permits the quantification of magnetic resonance parameters such as spin–lattice ( $T_1$ ) and spin–spin ( $T_2$ ) relaxation times, magnetic

\* Address correspondence to this author at the Departamento Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain (telephone +34 913943745; fax +34 913943743; e-mail icambero@vet.ucm.es).

<sup>†</sup> Departamento Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos.

<sup>§</sup> Instituto de Ciencia y Tecnología de la Carne.

<sup>#</sup> CAI de Resonancia Magnética Nuclear.

**Table 1.** Elaboration Procedure (Components, Addition Order, and Quantity Added) of the Different Systems Used

system <sup>a</sup>	mixture name <sup>b</sup>	meat emulsion (g)	NaCl aqueous solution		fibrinogen (mL)	thrombin (mL)
			NaCl % <sup>c</sup>	mL		
FT	FT00	0	0	0	100	10
	FTW0	0	0	11	100	10
	FTW1	0	11	11	100	10
	FTW2	0	22	11	100	10
ME	ME00	100	0	0	0	0
	MEW0	100	0	11	0	0
	MEW1	100	10	11	0	0
	MEW2	100	20	11	0	0
MEFT	MEFT00	100	0	0	10	10
	MEFTW0	100	0	11	10	10
	MEFTW1	100	12	11	10	10
	MEFTW2	100	24	11	10	10

<sup>a</sup> FT, fibrinogen and thrombin, both together commercially called Fibrinex (FNA Foods, Harimex Inc.). <sup>b</sup> ME, meat emulsion; MEFT, meat emulsion with fibrinogen and thrombin. <sup>c</sup> NaCl (% w/v) in the NaCl aqueous solution.

transfer ratio (MTR), and apparent diffusion coefficient (ADC). These parameters are potentially sensitive to local variations of water mobility resulting from the modification of water macromolecule interactions and changes in tissue structure. In food science, MRI techniques allow images of the interior of foods to be obtained. These images permit the quantification of  $T_1$ ,  $T_2$ , and ADC parameters to obtain information about several processes and material properties, such as mass and heat transfer, fat and ice crystallization, gelation, and water mobility. In this way, several applications of MRI in food such as to determine chemical composition, internal structure, and quality have been developed (18–20). The potential of MRI to characterize and understand meat characteristics and muscle structure has been studied by some authors (21–25). MRI has been used in meat to study carcass composition, adipose tissue distribution, connective tissue, and muscle fiber type (22, 23, 25). Some authors also showed that MRI parameters are correlated with meat properties such as pH, water-holding capacity, water content, and sensory attributes (26–29).

The first aim of this work was to study the textural properties and the MRI parameters of three model systems: fibrinogen–thrombin (FT) gels, meat emulsions (ME), and meat emulsion supplemented with fibrinogen–thrombin (MEFT). The second aim was to study the effect of water and NaCl addition on the structure of these model systems. Finally, the potential of FT to cold gelify meat systems was considered.

## MATERIALS AND METHODS

**Experimental Design.** Three different types of model systems (Table 1) were considered: (1) fibrinogen and thrombin (FT), (2) meat emulsion (ME), and (3) meat emulsion with fibrinogen and thrombin (MEFT).

Fibrinogen and thrombin, both together commercially called Fibrinex, were obtained from FNA Foods, Harimex Inc. Fresh pork (M. biceps femoris) was purchased from a local abattoir at 48 h post-mortem.

**Preparation of the Fibrinogen and Thrombin Model System (FT).** Independent fibrinogen (F) and thrombin (T) were thawed in plastic containers immersed in agitated water at 25 °C for 60 min. For each experience with fibrinogen and thrombin, 10 parts of fibrinogen was mixed with 1 part of thrombin (FT, 10:1, v/v) and shaken for 30 s. To obtain the different gels, mixtures of F and T with or without water and 0, 1, or 2% NaCl were prepared as indicated in Table 1: (a) 100 mL of fibrinogen and then 10 mL of thrombin were added (mixture named FT00); (b) 100 mL of fibrinogen was mixed with 11 mL of water and then 10 mL of thrombin was added (mixture FTW0); (c)

100 mL of fibrinogen was mixed with 11 mL of an aqueous saline solution with 11% of salt and then 10 mL of thrombin was added (samples with FT 10:1 and 1% of salt, mixture FTW1); and (d) 100 mL of fibrinogen was mixed with 11 mL of a NaCl aqueous solution with 22% of salt and then 10 mL of thrombin was added (samples with FT 10:1 and 2% of salt, mixture FTW2).

**Preparation of Meat Emulsion Model System (ME).** The visible fat and connective tissue were removed from the meat. Then, meat was added to a cutter (Robot Coupe R 8 V.V., Vincennes Cedex, France), where the material was cut and, after that, mixed with water or NaCl aqueous solution to obtain a homogeneous mixture. The process was performed by controlling the temperature to maintain the product at 0–2 °C. With this procedure four different (Table 1) meat emulsions were elaborated: (a) 100 g of meat (mixture with 0% of water and no salt, named ME00); (b) 100 g of meat was mixed with 11 mL of water (meat emulsion with 0% salt, mixture MEW0); (c) 100 g of meat was mixed with 11 mL of NaCl aqueous solution at 10% (meat emulsion with 1% of NaCl, mixture MEW1); and (d) 100 g of meat was mixed with 11 mL of NaCl aqueous solution at 20% (meat emulsion with 2% of NaCl, mixture MEW2).

**Preparation of Meat Emulsion Supplemented with Fibrinogen and Thrombin Model System (MEFT).** Four different types of mixture of meat emulsion, fibrinogen (F), and thrombin (T) (w/v/v) were elaborated (Table 1). The mixtures were (a) a mixture named MEFT00 composed of 100 parts of meat with 10 parts of F and 10 parts of T; (b) a mixture named MEFTW0 composed of 100 g of meat, 11 mL of water, 10 mL of F, and 10 mL of T; (c) a mixture named MEFTW1 composed of 100 g of meat with 11 mL of NaCl aqueous solution at 12% and then mixed with 10 mL of F and 10 mL of T (mixture with 1% of NaCl); and (d) a mixture named MEFTW2 composed of 100 g of meat with 11 mL of NaCl aqueous solution at 24% and then mixed with 10 mL of F and 10 mL of T (mixture with 2% of NaCl). These mixtures were gently prepared in a mixer by adding the ingredients in the following order: meat emulsion, NaCl aqueous solution, F, and T (Table 1).

Each mixture of fibrinogen and thrombin with or without NaCl (FT00, FTW0, FTW1 and FTW2), of meat emulsion with and without NaCl (MEW0, MEW1 and MEW2), and of meat emulsion with or without NaCl and FT (MEFTW0, MEFTW1 and MEFTW2) was extended (0.5 cm thick) in circular plastic containers (diameter = 9 cm) and immediately after were individually packed in plastic bags (Cryovac) in a high-vacuum machine (750/400 model, Vapta, SL, Spain). They were then stored for 24 h at 4 °C until analysis.

**Physicochemical Analysis.** The pH was determined in a homogenate of the sample with distilled water (1:10) (w/v), using a Crison Digit-501 pH-meter (Crison Instruments Ltd., Barcelona, Spain). Water activity ( $a_w$ ) was measured using a Decagon CX1 hygrometer (Decagon Devices Inc., Pullman, WA) at 25 °C. The water (oven air-drying method) content from the three model systems was analyzed following the AOAC (30) procedure. The protein (Kjeldhal nitrogen) and fat contents of the ME mixtures were determined using the methods of AOAC (30) and Bligh and Dyer as described by Hanson and Olley (31), respectively.

Water-holding capacity (WHC) was measured by using the Carver press method (32). This method used a 0.3 g sample pressed onto an oven-dried Whatman 125 mm filter paper. The WHC values were calculated as the percentage of water retained based on water content in the product before pressing. Four replicates of each sample were determined.

**Texture Analysis.** Texture profile analysis (TPA) was performed at about 22 °C using a TA.XT2i SMS Stable Micro Systems Texture Analyzer (Stable Microsystems Ltd., Surrey, U.K.) with the *Texture Expert* program. In general, this procedure involved the preparation of four cylinders of 1.5 cm height and 2 cm width from each sample. A double-compression cycle test was performed up to 50% compression of the original portion height with an aluminum cylinder probe P/25. A time of 5 s was allowed to elapse between the two compression cycles. Force–time deformation curves were obtained with a 25 kg load cell applied at a cross-head speed of 2 mm/s. The following parameters were quantified (33): hardness (N), maximum force required to compress the sample; springiness (m), ability of the sample to recover

its original form after deforming force was removed; adhesiveness ( $N \times s$ ), area under the abscissa after the first compression; and cohesiveness, extent to which the sample could be deformed prior to rupture.

**MRI Analysis.** All MRI measurements were performed using a Bruker BIOSPEC 47/40 spectrometer (Bruker GmbH, Ettlingen, Germany) operating at 4.7 T (200 MHz) equipped with a 12 cm diameter actively shielded imaging gradient capable of reaching 200 mT/m along all of the axes.

The samples for imaging were cut approximately 4 cm long, 3 cm wide, and 1.5 cm thick per sample. The samples were placed in a home-built shaped surface coil with dimensions of  $4 \times 4$  cm. A first global shimming was performed, and then three scout spin–echo experiments in axial, sagittal, and coronal direction were acquired to localize the slices in the desired place.

For measurements of  $T_2$ , separate images were acquired at 10 echo times (TE = 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, and 200 ms). All other imaging parameters remained constant between images (NA = 1; TR = 3046.1 ms; MTX =  $256 \times 256$ ; FOV =  $4 \times 4$  cm; slice thickness = 1 mm; number of slices = 10). The data are then fitted to a single-exponential decay, according to the equation

$$S(TE) = S_0 \exp^{-TE/T_2} \quad (1)$$

where  $S(TE)$  is the signal at this echo time (TE) and  $S_0$  is the image signal when TE is equal to zero.

For measurements of  $T_1$  separate images were acquired at six recovery times (TR = 310, 510, 1210, 2010, 3010, and 6010 ms); all other imaging parameters remained constant between images (NA = 1; TE = 20 ms; MTX =  $256 \times 128$ ; reconstructed  $256 \times 256$ ; FOV =  $4 \times 4$  cm; slice thickness = 1 mm; number of slices = 8). The data are then fitted to an exponential equation

$$S(TR) = S_0(1 - \exp^{-TR/T_1}) \quad (2)$$

where  $S(TR)$  is the signal at this recovery time (TR) and  $S_0$  is the image signal when TR is equal to zero.

To measure the ADC, separate images were acquired at four diffusion weightings ( $b$  value = 62.8, 370.8, 1131.4, and 2309.5  $s/mm^2$ ). All other imaging parameters remained constant between images (NA = 1; TR = 2000 ms; TE = 75 ms;  $\Delta$  = 50 ms;  $\delta$  = 10 ms; MTX =  $256 \times 128$ ; reconstructed  $256 \times 256$ ; FOV =  $4 \times 4$  cm; slice thickness = 1 mm, between slice gap of 0.5 mm; number of slices = 5). For ADC the echo signal intensity is fitted to the equation

$$ADC = \log(S/S_0)/b \quad (3)$$

where  $S$  is the signal diffusion weighted and  $S_0$  is the image signal when the value of diffusion weightings ( $b$ ) is equal to zero.

**Statistical Analysis.** An individual mixture was the experimental unit for all data analysis. To check the normal distribution (90% confidence) of samples, the Shapiro–Wilks test was applied. When samples fitted the normal distribution, one-way ANOVA analysis was performed. When samples did not fit the normal distribution, the Kruskal–Wallis test was used to test the null hypothesis that the medians of the variable within each of the levels of samples were the same. Duncan's test was used for multiple mean comparisons, Pearson product moment correlation ( $R$ ), and multiple regression analysis ( $R^2$ ), using a Durbin–Watson statistical tests, at 95% of confidence level, were performed to determine the relationships between data obtained by TPA, physicochemical analysis, and MRI parameters. The statistical analysis was carried out using Statgraphics Plus version 5.0. Data were presented as the means and the standard deviations (SD) of each mixture.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Physicochemical Characteristics.** The meat emulsions (ME) used had similar chemical compositions with percentages of protein and fat of about  $19 \pm 1$  and  $5 \pm 0.3$ , respectively (data not shown). The water activity ( $a_w$ ), water content (water %), pH value, and water-holding capacity (WHC) of the different model systems analyzed are listed in **Table 2**. The highest ( $p$

**Table 2.** pH Values, Water Content (%), Water Activity ( $a_w$ ), and Water-Holding Capacity (WHC %, Calculated as the Percentage of Water Retained Based on Water Content in the Product) of the Different Types of Systems Analyzed: Fibrinogen and Thrombin (FT System), Meat Emulsion (ME System), and Meat Emulsion with Fibrinogen and Thrombin (MEFT System)<sup>a</sup>

mixture <sup>b</sup>	system		
	FT	ME	MEFT
	pH		
O0	8.49 ± 0.08 a,α	5.74 ± 0.04 a,γ	5.98 ± 0.04 a,β
W0	8.42 ± 0.09 a,α	5.68 ± 0.02 b,β	5.67 ± 0.01 b,β
W1	8.48 ± 0.02 a,α	5.72 ± 0.01 a,γ	5.92 ± 0.03 a,β
W2	8.47 ± 0.04 a,α	5.79 ± 0.03 a,γ	6.01 ± 0.03 a,β
	Water Content (%)		
O0	87.2 ± 0.4 b,α	77.8 ± 0.4 b,β	78.4 ± 0.5 b,β
W0	88.1 ± 0.3 a,α	79.5 ± 0.3 a,β	80.6 ± 0.1 a,β
W1	88.4 ± 0.1 a,α	79.7 ± 0.9 a,β	80.4 ± 0.8 a,β
W2	88.2 ± 0.1 a,α	79.6 ± 1.1 a,β	80.3 ± 0.5 a,β
	$a_w$		
O0	0.996 ± 0.001 a,α	0.991 ± 0.001 a,β	0.992 ± 0.002 a,β
W0	0.991 ± 0.001 a,b,α	0.981 ± 0.002 c,β	0.985 ± 0.001 b,β
W1	0.992 ± 0.001 a,b,α	0.987 ± 0.003 a,b,β	0.986 ± 0.001 b,β
W2	0.984 ± 0.001 b,α	0.985 ± 0.001 b,c,α	0.984 ± 0.003 b,α
	WHC (%)		
O0	94.9 ± 0.6 a,β	96.4 ± 0.3 a,α	97.3 ± 0.9 a,α
W0	90.8 ± 0.1 c,β	95.6 ± 0.2 a,α	91.7 ± 0.7 c,β
W1	92.1 ± 0.2 b,β	95.9 ± 0.1 a,α	94.5 ± 0.2 b,α
W2	92.2 ± 0.4 b,β	96.2 ± 0.1 a,α	96.5 ± 0.7 a,α

<sup>a</sup> Different letters in the same column (a–c) indicate significant differences ( $p < 0.05$ ). Different letters in the same row (α–γ) indicate significant differences ( $p < 0.05$ ). <sup>b</sup> Mixtures analyzed: without water and NaCl (O0), with water (W0), with water and 1 and 2% of NaCl, respectively (W1 and W2), as indicated in **Table 1**.

$< 0.05$ ) pH and water content values corresponded to the fibrinogen–thrombin (FT) system.

The mixtures with the highest  $a_w$  ( $p < 0.05$ ) were those of system FT, except when NaCl at 2% was added (mixtures W2). With this NaCl concentration all of the systems presented similar  $a_w$  values.

The WHC was significantly higher ( $p < 0.05$ ) in the mixtures elaborated with meat emulsions (ME) and in the MEFT system, although in the latter the addition of water without NaCl (mixture W0) caused a significant decrease ( $p < 0.05$ ) in WHC up to values close to that observed in the FT system (FTW0). The addition of NaCl and water significantly decreased ( $p < 0.05$ ) the WHC of the FT, whereas no differences were observed in the ME system. The WHC values of the mixture of MEFT with added NaCl (2%) increased to the values of the samples without water and NaCl (MEFT00). Also, a significant negative correlation ( $R = -0.747$ ,  $p < 0.0001$ ) was observed between the FT concentration of the mixtures and the WHC, which could explain the lower WHC of the samples with higher FT concentration.

**Textural Properties.** Textural properties of samples analyzed are shown in **Table 3**. Results showed that the highest ( $p < 0.05$ ) hardness and cohesiveness values corresponded to the FT system, independently of the water or NaCl concentration. The high hardness and cohesiveness of the FT system could be attributed to the three-dimensional network formed throughout the process of fibrin polymerization responsible for the mechanical properties of the fibrin gels or clots (15–17). These results are in agreement with those of other authors (13, 15) who have described high rigidity and stiffness in fibrin clots. The high values of hardness and cohesiveness of the FT gels could indicate an important potential of the FT mixtures to give stability to different systems, that is, meat products. The ME



**Table 3.** Texture Profile Analysis (TPA) Parameters of the Different Types of Systems Analyzed: Fibrinogen and Thrombin (FT Systems), Meat Emulsion (ME Systems), and Meat Emulsion with Fibrinogen and Thrombin (MEFT Systems)<sup>a</sup>

mixture <sup>b</sup>	system		
	FT	ME	MEFT
Hardness (N)			
O0	70.1 ± 1.0 a,α	5.7 ± 0.1 a,γ	14.0 ± 1.4 a,β
W0	67.2 ± 1.7 a,α	4.1 ± 0.3 c,γ	14.3 ± 1.0 a,β
W1	68.1 ± 2.4 a,α	4.9 ± 0.3 b,γ	7.7 ± 1.3 b,β
W2	58.1 ± 2.6 b,α	4.3 ± 0.1 c,γ	5.3 ± 0.6 c,β
Adhesiveness (Ns)			
O0	-0.68 ± 0.06 a,β	-1.14 ± 0.24 b,α	-0.48 ± 0.32 a,β
W0	-0.65 ± 0.04 a,β	-0.97 ± 0.27 b,α	-0.36 ± 0.25 a,β
W1	-0.70 ± 0.06 a,β	-1.72 ± 0.22 a,α	-0.58 ± 0.30 a,β
W2	-0.68 ± 0.03 a,β	-1.70 ± 0.19 a,α	-0.59 ± 0.24 a,β
Cohesiveness			
O0	0.66 ± 0.01 a,α	0.46 ± 0.01 c,γ	0.54 ± 0.01 a,β
W0	0.68 ± 0.01 a,α	0.47 ± 0.03 c,γ	0.53 ± 0.02 a,β
W1	0.67 ± 0.01 a,α	0.49 ± 0.01 b,β	0.48 ± 0.01 b,β
W2	0.68 ± 0.02 a,α	0.52 ± 0.01 a,β	0.45 ± 0.03 c,γ
Springiness (m)10 <sup>-2</sup>			
O0	0.35 ± 0.01 a,β	0.32 ± 0.03 b,β	0.51 ± 0.01 a,α
W0	0.34 ± 0.01 a,β	0.37 ± 0.01 a,β	0.48 ± 0.04 a,b,α
W1	0.34 ± 0.02 a,γ	0.39 ± 0.02 a,β	0.46 ± 0.02 b,α
W2	0.36 ± 0.02 a,β	0.38 ± 0.03 a,β	0.45 ± 0.04 b,α

<sup>a</sup> Different letters in the same column (a–c) indicate significant differences ( $p < 0.05$ ). Different letters in the same row (α–γ) indicate significant differences ( $p < 0.05$ ). <sup>b</sup> Mixtures analyzed: without water and NaCl (O0), with water (W0), with water and 1 and 2% of NaCl, respectively (W1 and W2), as indicated in Table 1.

system showed the highest ( $p < 0.05$ ) adhesiveness and the lowest ( $p < 0.05$ ) hardness and cohesiveness. These results indicated a pseudoplastic fluid behavior of this system because of a lack of myofibrillar protein gelification. The highest ( $p < 0.05$ ) springiness values were those of the MEFT system. It could be observed that the MEFT system presented lower adhesiveness and higher ( $p < 0.05$ ) hardness, cohesiveness, and springiness than the ME system (Table 3). These results indicated that fibrinogen–thrombin modifies the textural properties of meat batters, giving a behavior similar to that of a gel. A positive correlation was obtained between hardness ( $R = 0.989$ ,  $p < 0.0001$ ) and cohesiveness ( $R = 0.953$ ,  $p < 0.0001$ ) and the presence of fibrinogen–thrombin. The hardness and cohesiveness values obtained for the MEFT system are in the range reported in restructured meat products formulated with Fibrimex (12).

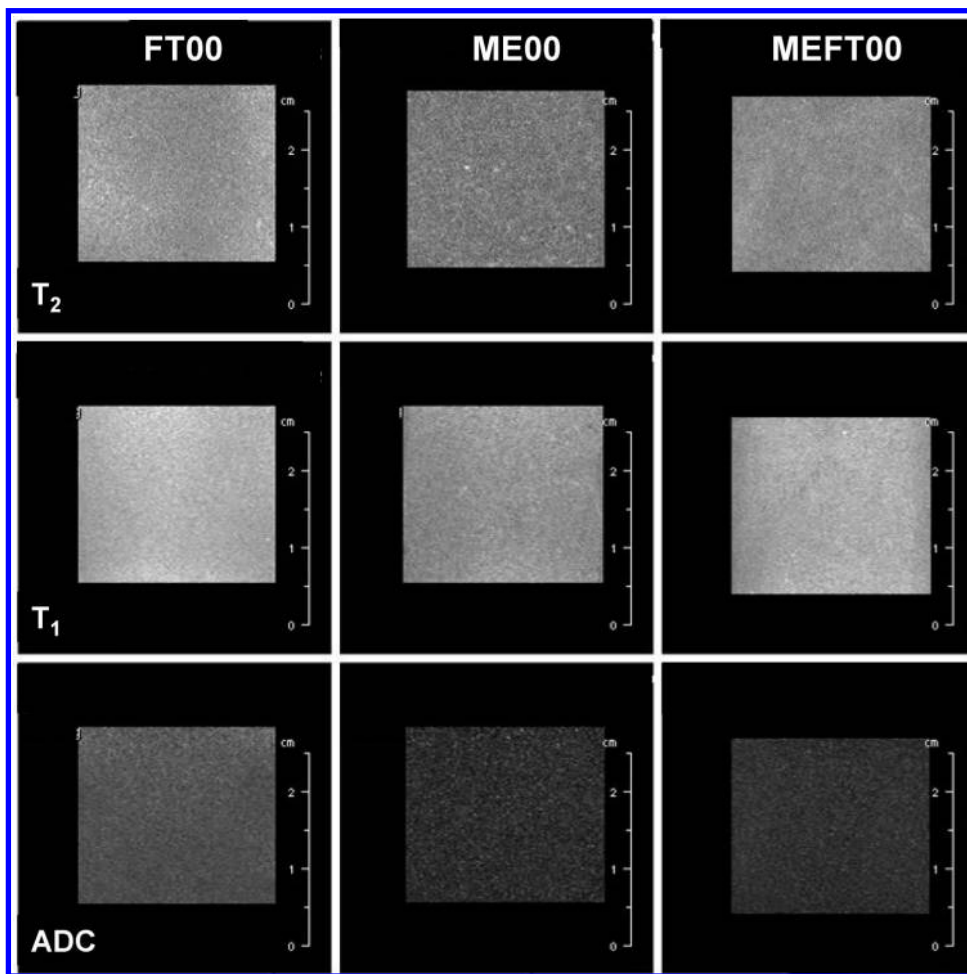
There are significant differences ( $p < 0.05$ ) in textural properties as a function of the addition of salt in the different systems analyzed. In the ME system there are significant differences ( $p < 0.05$ ) in hardness as a function of water and NaCl addition. In contrast, in MEFT significant differences ( $p < 0.05$ ) were observed only in hardness as a function of NaCl content ( $R = -0.928$ ,  $p < 0.0001$ ). In the FT system the lowest hardness ( $p < 0.05$ ) was observed when NaCl 2% was added. These results are in agreement with those of De Spirito et al. (34). These authors indicated that when the salt concentration is increased the fibrin, fibers are more branched and thinner. Some authors have identified a role for chloride ions as a basic physiological modulator of fibrin polymerization and therefore in the formation of fibrinogen gel (17, 35, 36). It has been described that  $\text{Cl}^-$  specifically binds to the fibrin fibers and opposes the lateral aggregation of protofibrils, resulting in

thinner fibers, impeding fibrin polymerization and the formation of the gel or clot three-dimensional network (17, 37).

There are no significant differences ( $p > 0.05$ ) in adhesiveness, cohesiveness, and springiness as a function of water without salt and water and NaCl addition in FT system. In the MEFT system a significant negative correlation was observed between cohesiveness ( $R = -0.888$ ,  $p < 0.0001$ ) or springiness ( $R = -0.427$ ,  $p < 0.05$ ) versus NaCl addition. The adhesiveness ( $R = 0.795$ ,  $p < 0.05$ ) and cohesiveness ( $R = 0.624$ ,  $p < 0.05$ ) of the ME system increased significantly when the NaCl concentration increased.

**MRI Analysis.** An example of  $T_1$ ,  $T_2$ , and ADC maps obtained by the MRI technique of FT00, ME00, and MEFT00 is presented in Figure 1. Regardless of their weighting ( $T_1$ ,  $T_2$ , or diffusion), all images display good signal homogeneity across the surface. The differences in map signal intensity of the three systems allow higher  $T_2$  values to be attributed to the FT00 and MEFT00 mixtures than to ME00. Similar comments can be made for the  $T_1$  values. A decrease in signal intensity was observed for ADC maps with FT00 > MEFT00 > ME00. In addition, Figure 2 shows the exponential curves obtained for the calculation of the  $T_1$ ,  $T_2$ , and ADC parameters of samples FT00, ME00, and MEFT00. The best fit and the regression coefficients ( $R^2$ ) are also shown in Figure 2. The regression coefficient values ranged between 0.980 and 0.997. Similar  $R^2$  values were found in the mixtures with added water and NaCl (W0, W1, and W2). The high  $R^2$  values indicated that the data points give a good fit. Five regions of interest (ROIs) were randomly selected on the central slice of each experiment to calculate the magnetic resonance parameters ( $T_1$ ,  $T_2$ , and ADC). Table 4 shows the mean values of  $T_1$ ,  $T_2$ , and ADC parameters for the different mixtures.

**Transverse or Spin–Spin Relaxation Time.** Transverse relaxation time ( $T_2$ ) is a measure of the relaxing effect of spin–spin interactions, which can be considered as the effect of water protons on other water or protein systems (FT, ME, and MEFT) protons. These spin–spin interactions are amplified by the forced proximity of the spins and the increased fraction of bound water. As a result,  $T_2$  is particularly sensitive to the porosity of the sample matrix.  $T_2$  values correlate most strongly with the bulk water content of a tissue and therefore changes in total water content, the degree of binding, and water compartmentalization will result in alterations in  $T_2$  (38). Table 4 shows  $T_2$  values for all of the mixtures analyzed. The FT system presented the highest  $T_2$  values and therefore the highest values of bulk water content. Weisel (15) described a small part of this type of gel or clot as being constituted by fibrin, the remainder being liquid occupying the space between the protein polymer. These authors showed that there are large spaces between the protofibrils in the fibers and much larger spaces between the fibers (15–17, 39). In this respect, it has been described (29, 40, 41) that there is a highly significant correlation between the  $T_2$  values obtained by MRI and the major component of  $T_2$  named  $T_{21}$  from low-field nuclear magnetic resonance, which is associated with water within the highly organized protein structures, for example, water in tertiary and/or quaternary protein structures. Therefore, the high  $T_2$  values obtained in the FT samples could indicate that the FT system presented more bulk water organized within large spaces between their protein polymers. In contrast, ME samples showed lower  $T_2$  values than FT and MEFT, probably because this is not an organized structure (such as a pseudoplastic fluid). The increase in relaxation time  $T_2$ , associated with the presence of fibrin (FT and MEFT systems), could indicate the formation of

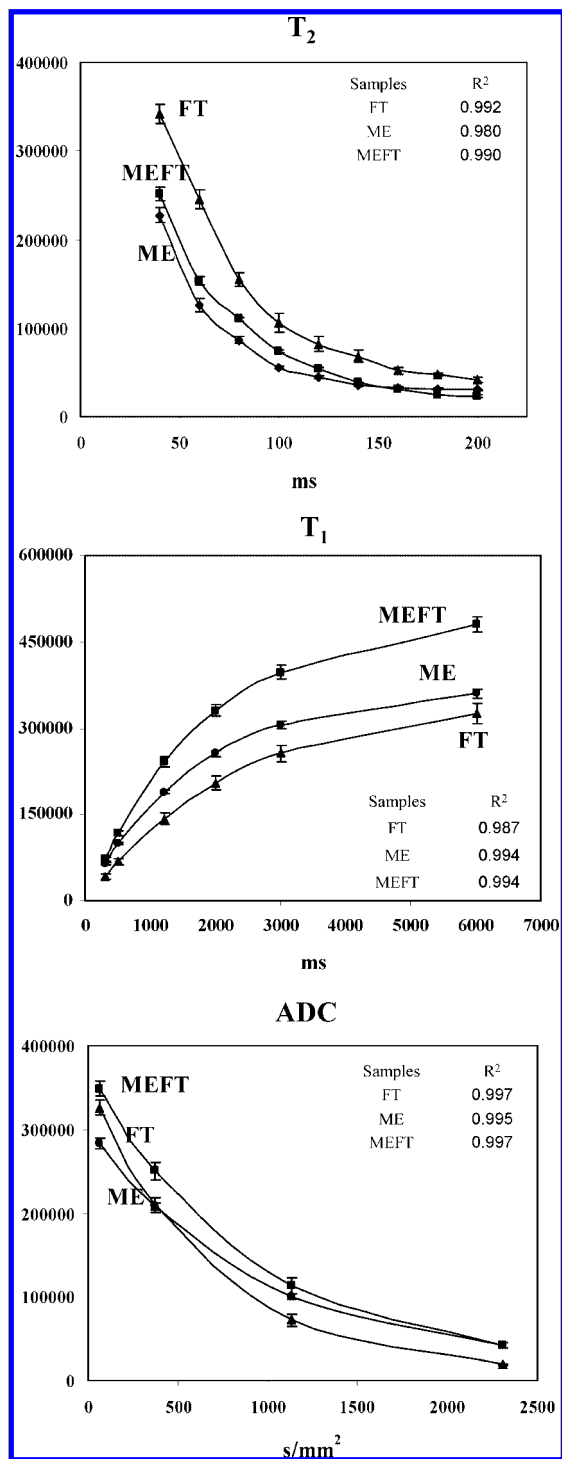


**Figure 1.** Representative MRI maps of  $T_2$ ,  $T_1$ , and ADC of mixture of fibrinogen and thrombin (FT00), meat emulsion (ME00), and meat emulsion supplemented with fibrinogen and thrombin (MEFT00) without NaCl and water.

a three-dimensional network with large spaces or pores (pools) increasing their size with the FT concentration in the system. As and Lens (42) reported that  $T_2$  is influenced by the pore size of the material in which water is examined. In principle, longer  $T_2$  times correspond to large pores in the alginate matrix (43). Simple linear regression analyses showed a significant positive correlation between the added fibrinogen concentration and the  $T_2$  values ( $R = 0.849$ ,  $p < 0.0001$ ). A significant positive correlation ( $R = 0.898$ ,  $p < 0.0001$ ) was found between  $T_2$  and water content and a negative one ( $R = -0.685$ ,  $p < 0.0005$ ) between  $T_2$  and WHC. These results are in agreement with previous works (44, 46) which indicated that the WHC values of meat are correlated to the  $T_2$  values, and some authors have suggested that  $T_2$  values are physically related to the state (bound or free) of the water embedded within the meat fibers (44). There were significant ( $p < 0.05$ ) differences in  $T_2$  values as a function of NaCl content in the different model systems analyzed (Table 4). The results indicated that NaCl addition produces an increase in  $T_2$  values in the three systems ( $p < 0.05$ ). These results could suggest that NaCl addition influences the structure of the different systems studied, probably increasing the pore size and the bulk water content. In myofibrils extracted from porcine muscle some authors have reported an increase in  $T_2$  relaxation times obtained by low-field NMR with increasing ionic strength by the addition of NaCl (47). Structural changes should be reflected in the rheological properties. In this way, a significant multiple linear regression ( $R^2 = 0.903$ ,  $p < 0.0001$ ) was found using the  $T_2$  values as the dependent variable and as independent variables the hardness, cohesiveness, and NaCl concentration

of the different mixtures. However, the structural changes associated with NaCl addition should be different for each system. In the FT and MEFT systems, a significant negative correlation between  $T_2$  values and hardness ( $R = -0.733$ ,  $p < 0.05$  and  $R = -0.853$ ,  $p < 0.0001$ , respectively) was observed. These results may be related with those of other authors (17, 35) who indicated that fibrin polymerization is inhibited by the presence of  $\text{Cl}^-$ , resulting in a less dense and more branched fibrin matrix. Hence, in the MEFT system the springiness of the gel increased significantly when the  $T_2$  values decreased ( $R = -0.622$ ,  $p < 0.05$ ). However, in the ME system a significant positive correlation was found between cohesiveness and  $T_2$  values ( $R = 0.596$ ,  $p < 0.05$ ). In this system the addition of NaCl at 2% originated a marked ( $p < 0.05$ ) increase in  $T_2$ , probably because the addition of NaCl to meat batter causes changes in the conformation and stability of meat proteins, which increases the solubility of meat proteins and the myofibrillar structure opening (45). Both increases could improve the molecular interactions (giving rise to greater cohesiveness) and bulk water content (higher  $T_2$ ).

**Longitudinal or Spin–Lattice Relaxation Time.** Longitudinal relaxation time ( $T_1$ ) is a measure of the relaxing effect of the external environment on the spins. The  $T_1$  describes the mobility of the molecules (particularly water molecules) and hence the binding of water molecules, for instance, to macromolecules. Free water presents a high  $T_1$  because of its mobility; when water is bound to macromolecules, there is a loss of mobility with easier energy release and a decrease in the  $T_1$  value. An increase in water mobility implies a higher  $T_1$  value (48).



**Figure 2.** Representative graphs of the exponential time decay of the echo amplitude for selected points of  $T_1$ ,  $T_2$ , and ADC parameters and the regression coefficient values of the curve fit of mixture of fibrinogen and thrombin (FT00), meat emulsion (ME00), and meat emulsion supplemented with fibrinogen and thrombin (MEFT00) without NaCl and water.

The FT gel showed the higher  $T_1$  values ( $p < 0.05$ ). A significant ( $p < 0.05$ ) (Table 4) increase in the transverse relaxation time  $T_1$  of the samples with fibrinogen–thrombin (FT and MEFT) was observed when compared to the samples without fibrinogen–thrombin (ME). The results indicated that fibrinogen addition produces an increase in  $T_1$  ( $R = 0.846$ ,  $p < 0.0001$ ). These results could indicate that when fibrinogen–thrombin is forming the gel network, the water presents a free

**Table 4.** MRI Parameters of the Different Types of Systems Analyzed: Fibrinogen and Thrombin (FT Systems), Meat Emulsion (ME Systems), and Meat Emulsion with Fibrinogen and Thrombin (MEFT Systems)<sup>a</sup>

mixture <sup>b</sup>	system		
	FT	ME	MEFT
$T_2^c$ (ms)			
00	70.4 ± 1.7 d,α	54.8 ± 0.5 c,γ	58.6 ± 0.6 d,β
W0	74.5 ± 0.8 c,α	53.3 ± 0.8 c,γ	62.3 ± 0.8 c,β
W1	82.4 ± 1.6 b,α	56.9 ± 0.7 b,γ	64.2 ± 0.7 b,β
W2	92.3 ± 1.7 a,α	64.0 ± 1.3 a,γ	66.1 ± 0.7 a,β
$T_1^d$ (ms)			
00	2325.9 ± 48 a,α	1664.9 ± 37 c,γ	1888.8 ± 53 b,β
W0	2363.2 ± 55 a,α	1982.4 ± 19 b,γ	2104.9 ± 30 a,β
W1	2302.9 ± 95 a,α	1702.9 ± 31 c,γ	1769.2 ± 40 c,β
W2	2355.9 ± 73 a,α	2070.6 ± 55 a,β	1845.5 ± 26 b,c,γ
ADC <sup>e</sup> ( $\text{mm}^2 \text{s}^{-1}$ )10 <sup>-3</sup>			
00	1.37 ± 0.03 b,α	0.91 ± 0.01 c,γ	1.01 ± 0.04 b,β
W0	1.21 ± 0.06 c,α	0.95 ± 0.02 b,γ	0.99 ± 0.02 b,β
W1	1.44 ± 0.04 a,α	0.96 ± 0.03 b,γ	1.05 ± 0.03 a,β
W2	1.49 ± 0.04 a,α	1.02 ± 0.02 a,β	1.04 ± 0.03 a,β

<sup>a</sup> Different letters in the same column (a–c) indicate significant differences ( $p < 0.05$ ). Different letters in the same row (α–γ) indicate significant differences ( $p < 0.05$ ). <sup>b</sup> Mixtures analyzed: without water and NaCl (00), with water (W0), with water and 1 and 2% of NaCl, respectively (W1 and W2), as indicated in Table 1. <sup>c</sup>  $T_1$  = longitudinal relaxation time (milliseconds). <sup>d</sup>  $T_2$  = transverse relaxation time (milliseconds). <sup>e</sup> ADC = apparent diffusion coefficient.

distribution (water retained in microspaces without interactions with structural macromolecules and with more mobility).

There were no significant differences ( $p > 0.05$ ) between the  $T_1$  values of the FT mixture with different water and NaCl contents. Because around 88% of the gel is composed of water (Table 2), the fibrin has a negligible effect on water protons, and the  $T_1$  is not influenced by the fibrin matrix. In mixtures of the ME and MEFT systems, significant ( $p < 0.05$ ) variations of  $T_1$  were observed in relation to water and NaCl addition. The highest  $T_1$  in the ME system corresponded with mixtures with 10% added water and 2% of NaCl (MEW2). This salt concentration is the usual one in meat products to facilitate the myofibrillar protein partial solubilization (49). In this condition, the  $\alpha$ -helix structure is opened with a decrease in the water present in the hydration layers and, because of this, the water acquires more mobility and  $T_1$  should increase. The presence of 1% NaCl should not be sufficient to modify the myofibrillar protein structure, and the  $T_1$  of these gels is similar to that of ME00 mixtures. In the MEFT system, the effect of NaCl on  $T_1$  was not as clear, probably because of the effect of the fibrin matrix. The mixtures of the ME and MEFT systems with water but without NaCl (MEW0 and MEFTW0) showed  $T_1$  values higher than in mixtures without water (ME00 and MEFT), which could indicate that the water added is not bound by the macromolecular structure of the gels.

A simple linear regression analysis was used to determine the relationship between  $T_1$  (Table 4) and different physico-chemical characteristics (Table 2). The significant negative correlation obtained between  $T_1$  values and the WHC of the different systems ( $R = -0.738$ ,  $p < 0.0001$ ) can be explained by the fact that an increase in water freedom implies a higher  $T_1$  value. The significant positive correlation ( $R = 0.848$ ,  $p < 0.0001$ ) between  $T_1$  and water content of the different systems could indicate a water incorporation without interactions with macromolecules. In the three systems studied, cohesiveness was observed to increase when the  $T_1$  value increased ( $R = 0.905$ ,  $p < 0.0001$ ), which could indicate that cohesiveness is depend-



ent on the development of interactions between macromolecules (protein–protein) maintaining the water in the free form.

In the ME system, the hardness increased when the  $T_1$  values decreased ( $R = -0.836$ ,  $p < 0.0001$ ), which could indicate that hardness is related to the macromolecules' density. A significant negative correlation was also observed between hardness and water content of the ME system ( $R = -0.866$ ,  $p < 0.01$ ). However, the hardness of the FT and MEFT systems increased significantly with  $T_1$  values ( $R = 0.912$ ,  $p < 0.0001$ ) which, as in the case of cohesiveness, could indicate that this rheological property mainly depends on the establishment of inter/intramolecular interactions. In these systems, no correlation was found ( $p > 0.05$ ) between water content and TPA properties. These observations are closely related with those of  $T_2$  and suggest that fibrin could modify the meat emulsion conformation, conferring a gel network behavior with the presence of large spaces (high  $T_2$ ) where water could move freely (high  $T_2$  and  $T_1$ ).

**ADC.** The ADC is a measure of the average translational motion of water and reflects the mobility of the molecules in their microenvironment. Water in a free environment can diffuse easily in all directions. In biological tissue there are barriers (such as cell walls and large-chain proteins) that reduce the ability of water to diffuse, and the destruction of these biological barriers is reflected by an increase in the ADC (50). **Table 4** shows that the ADC values of the mixtures with fibrinogen–thrombin (FT and MEFT) are higher ( $p < 0.05$ ) than those of system ME, with the highest corresponding to fibrin gels (FT). In alginate gels ADC values close to that of FT (**Table 4**) have been described (43). These high ADC values could be attributed to the fact that the matrix formed by the gelifying agent (fibrinogen–thrombin) does not restrict or compartmentalize water (43).

A global analysis of the three MRI parameters indicates that the fibrin matrix presents a structure with many and large pores, bulk water, and higher translational motion of water. These characteristics of the MEFT system came from FT, although the MEFT system showed less mobility of the water molecules in their microenvironment than FT ( $p < 0.05$ ). On the contrary, meat emulsions (ME) showed the lowest ADC ( $p < 0.05$ ), indicating a compact matrix with restricted diffusive motion of water, which could be due to the pseudoplastic fluid character of this system.

In the different mixtures of the three systems studied (FT, ME, and MEFT), there were significant variations ( $p < 0.05$ ) in ADC values associated with water and NaCl addition. The addition of 2% NaCl produces a significant increase in ADC ( $p < 0.05$ ). These results are related with the effects of NaCl on the ME and FT systems. A NaCl solution at 2% partially solubilizes the myofibrillar proteins and opens the myofibrillar structure (45), with higher  $T_1$  and  $T_2$  and less water restriction (higher ADC). In this way, the cohesiveness of the ME system was found to rise significantly when the ADC values increased ( $R = 0.817$ ,  $p < 0.0001$ ). This correlation could be due to the establishment of interactions (mainly hydrophobic and electrostatic bounds) between portions of salt-solubilized  $\alpha$ -helix, which should increase the system cohesion (45). In this microenvironment, the water mobility was less restricted.

The increase in ADC in the FT system with 2% NaCl could be related to inhibition of the fibrin polymerization by the  $\text{Cl}^-$  effect (17, 35). It could be possible that these systems present less compartmentalized water and therefore a higher ADC. In relation to these results, a significant correlation between ADC

values and FT hardness ( $R = -0.536$ ,  $p < 0.05$ ) has been determined. Possibly, in the MEFT system the increase in ADC associated with NaCl addition was related to the two salt effects, previously indicated for the ME and FT systems. No significant ( $p > 0.05$ ) correlation in the MEFT system was found between ADC and the TPA properties.

**Conclusions.** From the global analysis of the fibrin gels and meat systems with and without fibrinogen–thrombin addition it is possible to conclude the following:

The fibrin gels were characterized with high water content, water activity, hardness, and cohesiveness. The MRI analysis reflected a structure with large pores (high  $T_2$ ), high bulk water content (high  $T_1$ ), and low content of compartmentalized water (high ADC).

The meat emulsions were characterized by high adhesiveness and low hardness. The MRI analysis showed a less organized matrix, low porosity (low  $T_2$ ), high binding of water molecules (low  $T_1$ ), and restricted diffusive motion of water (low ADC).

The addition of fibrinogen–thrombin to meat emulsions produces gel network behavior increasing the springiness and hardness. The MRI parameters were higher than those of meat emulsions showing a higher content of bulk water organized within a porous structure (higher  $T_1$  and  $T_2$ ) and higher diffusive motion of water (high ADC).

The addition of NaCl at 2% to fibrinogen–thrombin and meat emulsion fibrinogen thrombin systems caused a reduction in the gel hardness. In these systems a significant negative correlation was found between hardness and transverse relaxation time ( $T_2$ ) or apparent diffusion constants (ADC).

## LITERATURE CITED

- (1) Cambero, M. I.; Lopez, M. O.; de la Hoz, L.; Ordoñez, J. A. Restructured meat. Composition and binding-properties. *Rev. Agroquim. Tecnol.* **1991**, 31, 293–309.
- (2) Varnam, A. H.; Sutherland, J. P. Uncooked, comminuted and reformed meat products. In *Meat and Meat Products. Technology, Chemistry and Microbiology*; Varnam, A. H., Sutherland, J. P., Eds.; Chapman and Hall: London, U.K., 1995; pp 121–153.
- (3) Shahidi, F.; Synowiecki, J. Protein hydrolyzates form seal meat as phosphate alternatives in food processing applications. *Food Chem.* **1997**, 60, 29–32.
- (4) Desmond, E. Reducing salt: a challenge for the meat industry. *Meat Sci.* **2006**, 74, 188–196.
- (5) Law, N.; Frost, C.; Wald, N. By how much does dietary salt reduction lower blood pressure. I—Analysis of observational data among populations. *Br. Med. J.* **1991**, 302, 811–815.
- (6) Kemi, V. E.; Karkkainen, M. U.; Lamberg-Allardt, C. J. E. High phosphorus intakes acutely and negatively affect Ca and bone metabolism in a dose-dependent manner in healthy young females. *Br. J. Nutr.* **2006**, 96, 545–552.
- (7) Means, W. J.; Clarke, A. D.; Sofos, J. N.; Schmidt, G. R. Binding, sensory and storage properties of algin/calcium structured beef steaks. *J. Food Sci.* **1987**, 52, 252–256.
- (8) Trout, G. R. The effect of carbonate and sodium alginate on the colour and bind strength of restructured beef steaks. *Meat Sci.* **1989**, 25, 163–175.
- (9) Motoki, M.; Seguro, K. Transglutaminase and its use for food processing. *Trends Food Sci. Technol.* **1998**, 9, 204–210.
- (10) Boles, J. A.; Shand, P. J. Effect of comminution method and raw binder system in restructured beef. *Meat Sci.* **1998**, 49, 297–307.
- (11) Boles, J. A.; Shand, P. J. Effects of raw binder system, meat cut and prior freezing on restructured beef. *Meat Sci.* **1999**, 53, 233–239.
- (12) Flores, N. C.; Boyle, E. A. E.; Kastner, C. L. Instrumental and consumer evaluation of pork restructured with Activa (TM) or with Fibrimex (TM) formulated with and without phosphate. *LWT—Food Sci. Technol.* **2007**, 40, 179–185.

- (13) Ryan, E. A.; Mockros, L. F.; Weisel, J. W.; Lorand, L. Structural origin of fibrin clot rheology. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 2813–2826.
- (14) Gentry, P. A. Comparative aspects of blood coagulation. *Vet. J.* **2004**, *168*, 238–251.
- (15) Weisel, J. W. The mechanical properties of fibrin for basic scientists and clinicians. *Biophys. Chem.* **2004**, *112*, 267–276.
- (16) Weisel, J. W. Fibrinogen and fibrin. *Adv. Protein Chem.* **2005**, *70*, 247–256.
- (17) Standeven, K. F.; Ariens, R. A. S.; Grant, P. J. The molecular physiology and pathology of fibrin structure/function. *Blood Rev.* **2005**, *19*, 275–288.
- (18) McCarthy, M. J.; Kauten, R. J. Magnetic resonance imaging applications in food research. *Trends Food Sci. Technol.* **1990**, *1*, 134–139.
- (19) Hills, B. Food processing: an MRI perspective. *Trend Food Sci. Technol.* **1995**, *6*, 111–117.
- (20) Schmidt, S. J.; Sun, X. Z.; Litchfield, J. B. Applications of magnetic resonance imaging in food science. *Crit. Rev. Food Sci.* **1996**, *36*, 357–385.
- (21) Tingle, J. M.; Pope, J. M.; Baumgartner, P. A.; Sarafis, V. Magnetic resonance imaging of fat and muscle distribution in meat. *Int. J. Food Sci. Technol.* **1995**, *30*, 437–446.
- (22) Bonny, J. M.; Laurent, W.; Labas, R.; Taylor, R.; Berge, P.; Renou, J. P. Magnetic resonance imaging of connective tissue: a non-destructive method for characterising muscle structure. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *81*, 337–341.
- (23) Laurent, W.; Bonny, J. M.; Renou, J. P. Muscle characterisation by NMR imaging and spectroscopic techniques. *Food Chem.* **2000**, *69*, 419–426.
- (24) Renou, J. P.; Foucat, L.; Bonny, J. M. Magnetic resonance imaging studies of water interactions in meat. *Food Chem.* **2003**, *82*, 35–39.
- (25) Mitchell, A. D.; Scholz, A. M.; Wang, P. C.; Song, H. Body composition analysis of the pig by magnetic resonance imaging. *J. Anim. Sci.* **2001**, *79*, 1800–1813.
- (26) Guiheneuf, T. M.; Tessier, J. J.; Herrod, N. J.; Hall Laurant, D. Magnetic resonance imaging of meat products: automated quantitation of the NMR relaxation parameters of cured pork, by both bulk NMR and MRI methods. *J. Sci. Food Agric.* **1996**, *71*, 163–173.
- (27) Ruiz-Cabrera, M. A.; Gou, P.; Foucat, L.; Renou, J. P.; Daudin, J. D. Water transfer analysis in pork meat supported by NMR imaging. *Meat Sci.* **2004**, *67*, 169–178.
- (28) Cernadas, E.; Carrion, P.; Rodriguez, P. G.; Muriel, E.; Antequera, T. Analyzing magnetic resonance images of Iberian pork loin to predict its sensorial characteristics. *Comput. Visualization Image Und.* **2005**, *98*, 344–360.
- (29) Shaarani, S. M.; Nott, K. P.; Hall, L. D. Combination of NMR and MRI quantitation of structure and structure changes for convection cooking of fresh chicken meat. *Meat Sci.* **2006**, *72*, 398–403.
- (30) AOAC. *Official Methods of Analysis*, 16th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Washington, DC, 1995.
- (31) Hanson, S. W. F.; Olley, J. Application of the Bligh and Dyer method of lipid extraction to tissue homogenates. *Biochem. J.* **1963**, *89*, 101P–102P.
- (32) Kauffman, R. G.; Eikelenboom, G.; van der Wal, P. G.; Merkus, G.; Zaar, M. The use of filter paper to estimate drip loss of porcine musculature. *Meat Sci.* **1986**, *18*, 191–198.
- (33) Bourne, M. C. Texture profile analysis. *Food Technol.* **1978**, *32*, 62–66.
- (34) De Spirito, M.; Arcovito, G.; Papi, M.; Rocco, M.; Ferri, F. Small- and wide-angle elastic light scattering study of fibrin structure. *J. Appl. Crystallogr.* **2003**, *36*, 636–641.
- (35) Di Stasio, E.; Nagaswami, C.; Weisel, J. W.; Di Cera, E.  $\text{Cl}^-$  regulates the structure of the fibrin clot. *Biophys. J.* **1998**, *75*, 1973–1979.
- (36) Papi, M.; Arcovito, G.; De Spirito, M.; Amiconi, G.; Bellelli, A.; Boumis, G. Simultaneous static and dynamic light scattering approach to the characterization of the different fibrin gel structures occurring by changing chloride concentration. *Appl. Phys. Lett.* **2005**, *86*, 183901–183903.
- (37) Vindigni, A.; Di Cera, E. Release of fibrinopeptides by the slow and fast forms of thrombin. *Biochemistry* **1996**, *35*, 4417–26.
- (38) Boulby, P. A.; Rugg-Gunn, F.  $T_2$ : the transverse relaxation time. In *Quantitative MRI of the Brain. Measuring Changes Caused by Disease*; Tofts, P., Ed.; Wiley: West Sussex, U.K., 2003; pp 143–173.
- (39) Müller, M. F.; Ris, H.; Ferry, J. D. Electron microscopy of fine fibrin clots and fine and coarse fibrin films: observations of fibers in cross-section and in deformed states. *J. Mol. Biol.* **1984**, *174*, 369–384.
- (40) Bertram, H. C.; Karlsson, A. H.; Rasmussen, M.; Dønstrup, S.; Petersen, O. D.; Andersen, H. J. Origin of multiexponential  $T_2$  relaxation in muscle myowater. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 3092–3100.
- (41) Bertram, H. C.; Purslow, P. P.; Andersen, H. J. Relationship between meat structure, water mobility and distribution: A low-field nuclear magnetic resonance study. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 824–829.
- (42) As, H. V.; Lens, P. Use of  $^1\text{H}$ -NMR to study transport processes in porous biosystems. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *26*, 43–52.
- (43) Simpson, N. E.; Grant, S. C.; Blackband, S. J.; Constantinidis, I. NMR properties of alginate microbeads. *Biomaterials* **2003**, *24*, 4941–4948.
- (44) Brown, R. J. S.; Capozzi, F.; Claudio, C.; Cremonini, M. A.; Petracci, M.; Placucci, G. Relationships between  $^1\text{H}$  NMR relaxation data and some technological parameters of meat: a chemometric approach. *J. Magn. Reson.* **2000**, *147*, 89–94.
- (45) Brøndum, J.; Munck, L.; Henckel, P.; Karlsson, A.; Tornberg, E.; Engelsen, S. B. Prediction of water-holding capacity and composition of porcine meat with comparative spectroscopy. *Meat Sci.* **2000**, *55*, 177–185.
- (46) Bertram, H. C.; Andersen, H. J.; Karlsson, A. H. Comparative study of low-field NMR relaxation measurements and two traditional methods in the determination of water holding capacity of pork. *Meat Sci.* **2001**, *57*, 125–132.
- (47) Bertram, H. C.; Kristensen, M.; Andersen, H. J. Functionality of myofibrillar proteins as affected by pH, ionic strength and heat treatment—a low-field NMR study. *Meat Sci.* **2004**, *68*, 249–256.
- (48) Gowland, P. A.; Stevenson, V. L.  $T_1$ : the longitudinal relaxation time. In *Quantitative MRI of the Brain. Measuring Changes Caused by Disease*; Tofts, P., Ed.; Wiley: West Sussex, U.K., 2003; pp 111–143.
- (49) Gordon, A.; Barbut, S. Mechanisms of meat batter stabilization: a review. *Crit. Rev. Food Sci.* **1992**, *32*, 299–332.
- (50) Wheeler-Kingshott, A. M.; Barker, G. J.; Steens, S. C. A.; van Buchem, M. ADC: the diffusion of water. In *Quantitative MRI of the Brain. Measuring Changes Caused by Disease*; Tofts, P., Ed.; Wiley: West Sussex, U.K., 2003; pp 203–210.

Received for review July 17, 2007. Revised manuscript received September 12, 2007. Accepted September 19, 2007. We are grateful for the financial support of Project AGL04-6773 (Ministerio de Ciencia y Tecnología) and TEMINYSA program (S-0505/AGR-0314, Comunidad de Madrid). A.M.H. was supported by a contract from the Juan de la Cierva program and M.D.R.d.A. was awarded a grant from the Ministerio de Educación y Ciencia.

JF0721321

**ARTÍCULO 2.2.**

**Magnetic resonance imaging study of the cold-set gelation  
of meat systems containing plasma powder**

**Food Research Internacional. (2009). 42 (9), 1362 – 1372.**





## Magnetic resonance imaging study of the cold-set gelation of meat systems containing plasma powder

A.M. Herrero<sup>a</sup>, L. de la Hoz<sup>b</sup>, J.A. Ordóñez<sup>b</sup>, D. Castejón<sup>c</sup>, M.D. Romero de Avila<sup>b</sup>, M.I. Cambero<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto del Frío (CSIC), Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Departamento Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, 28040 Madrid, Spain

<sup>c</sup> CAI de Resonancia Magnética Nuclear, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 4 December 2008

Accepted 24 June 2009

#### Keywords:

Meat systems

Plasma powder

Cold-set binding agent

Magnetic resonance imaging (MRI)

### ABSTRACT

The effect of rehydrated plasma powder addition to meat systems formulated with and without NaCl was evaluated by magnetic resonance imaging (MRI), texture and physico-chemical analysis. Different model systems were elaborated: rehydrated plasma powder (PPW), meat batter (ME) and ME with PPW (MEPPW) with (MEPPW2) and without (MEPPW0) NaCl addition. The effects of PPW addition to ME were different depending on the presence or absence of NaCl. The PPW addition caused high mechanical stability to ME without salt and an increase ( $p < 0.05$ ) of hardness, cohesiveness, springiness and breaking force. The study of the structure of MEPPW0 by MRI showed higher  $T_2$  (associated to larger pores),  $T_1$  (indicating more water mobility) and apparent diffusion coefficient (ADC) values than those of ME. When salt was added (MEPPW2) there was a decrease of hardness, breaking force,  $T_1$  and ADC and an increase of the adhesiveness and  $T_2$  with respect to MEPPW0.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Several commercial cold-set binding systems (alginate–calcium, transglutaminase of different origins, fibrinogen and thrombin) are available to the meat industry, especially for manufacturing restructured muscle products and for binding whole muscle pieces to resemble hams (Boles & Shand, 1998, 1999; Flores, Boyle, & Kastner, 2007; Means, Clarke, Sofos, & Schmidt, 1987; Motoki & Seguro, 1998; Trout, 1989). The use of these binding agents also offers other advantages in the manufacture of meat products such as improved emulsion/batter stability, a better yield and slicing properties (Boles & Shand, 1998, 1999; Flores et al., 2007; Jarmoluk & Pietrasik, 2003; Monahan & Troy, 1997; Ruiz-Carrascal & Regenstein, 2002). Moreover, the meat product manufactured with cold-set binding systems may reduce or eliminate the need to add sodium chloride and phosphates, which are related to cardiovascular and bone diseases (Kemi, Karkkainen, & Lamberg-Allardt, 2006; Law, Frost, & Wald, 1991). Every cold-set binding system works in a different way and can react differently to changes in ingredients and in manufacturing conditions of meat products. General information related to the practical aspects of how the binders work and how processing methods affect the finished product characteristics are

required to increase the use of these binding agents. In this way, the effects of cold-set binding systems with mixtures of fibrinogen and thrombin (Fibrimex™, FNA Foods, Harimex Inc.) on consumer acceptance, physico-chemical, textural and structural properties in the manufacture of meat products have been studied (Boles & Shand, 1998, 1999; Flores et al., 2007; Herrero et al., 2007). Recently, it has been possible to utilize plasma powder as cold-set binding agent: it is obtained from bovine and porcine blood plasma and has excellent functional properties. These plasma products are prepared following the method described by Roodink and Zuijdweg (2003). With this procedure a plasma protein concentrate is obtained which contains a complex mix of proteins such as serum albumin, globulins and fibrinogen (at least 1% of the weight). Finally, the concentrate is spray-dried to form a powder (Roodink & Zuijdweg, 2003) intended for use in foodstuffs, in such a manner that the temperature of the product is maintained at less than 60 °C. These conditions allow the natural functions and activities of fibrinogen and the other proteins and enzymes of the blood plasma to be maintained. This blood plasma powder offers several advantages to the food industry when compared with other cold-set binding systems that are also of blood origin (such as the combination of fibrinogen and thrombin solutions). Plasma powder is a single-component system powder, easily stored and preserved. Previous research has indicated that the heat treatment of plasma proteins induces denaturation and aggregation, which results in a three-dimensional network forming consistent gels (Dávila, Parés, Cuvelier, & Relkin, 2007; Hermansson, 1982; Parés, Saguer, Saurina,

\* Corresponding author. Address: Departamento Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 913943745; fax: +34 913943743.

E-mail address: [icambero@vet.ucm.es](mailto:icambero@vet.ucm.es) (M.I. Cambero).



Suñol, & Carretero, 1998). However, more information related to physico-chemical, textural and structural changes produced by the addition of plasma powder to meat systems is required to increase the use of this cold-set binding agent.

Raman spectroscopy has been used in a previous work (Herrero, Cambero, Ordóñez, de la Hoz, & Carmona, 2009) to evaluate the protein structural changes that occur with the addition of plasma powder to meat systems. It was established that the addition of rehydrated plasma powder to meat batter produced a decrease of  $\alpha$ -helix and an increase of turns (sum of  $\beta$  and  $\gamma$  turns) as well as an unordered structure (Herrero et al., 2009). However, an in depth study is necessary to evaluate the structural changes that occur in the meat system formulated with the addition of this cold-set binding agent so as to completely understand the structural changes that occur in the meat system with the plasma powder addition. In this way, magnetic resonance imaging (MRI) is a non-invasive and non-destructive technique which provides structural information, mainly about water structure and its structural changes, about biological tissues through parameters such as transverse relaxation time ( $T_2$ ) and longitudinal relaxation time ( $T_1$ ), and the apparent diffusion coefficient (ADC). These magnetic resonance parameters are potentially sensitive to variations of bulk water ( $T_2$ ), water mobility ( $T_1$ ) and facility of diffusion of the water in all directions (ADC) resulting from the modification of water-macromolecule interactions and changes in tissue structure (Boulby & Rugg-Gunn, 2003; Gowland & Stevenson, 2003; Wheeler-Kingshott, Barker, Steens, & van Buchem, 2003). Magnetic resonance parameters such as  $T_2$ ,  $T_1$  and ADC together provide complete information about biological tissue structures. MRI has several applications in meat science (Bertram & Andersen, 2004). In particular, some authors have indicated that MRI permits the study of carcass composition, adipose tissue distribution, connective tissue and muscle fibre type (Bonny et al., 2000; Laurent, Bonny, & Renou, 2000; Mitchell, Scholz, Wang, & Song, 2001; Tingle, Pope, Baumgartner, & Sarafis, 1995). MRI can also help to understand the structural changes during processing and storage of meat (Bertram, Whittaker, Shorthose, Andersen, & Karlsson, 2004; Guiheneuf, Parker, Tessier, & Hall, 1997; Guiheneuf, Tessier, Herrod, & Hall, 1996; Renou, Foucat, & Bonny, 2003). Moreover, MRI parameters are also correlated with meat properties such as water content and sensory attributes (Cernadas, Carrion, Rodriguez, Muriel, & Antequera, 2005; Ruiz-Cabrera, Gou, Foucat, Renou, & Daudin, 2004; Shaarani, Nott, & Hall, 2006). Recently, an MRI study has been carried out in our laboratory to identify the structural changes produced by the addition of a cold-set binding system such as fibrinogen and thrombin on meat systems (Herrero et al., 2007).

The primary aim of this work was to study the changes in the physico-chemical, textural and magnetic resonance imaging parameters produced by the incorporation of plasma powder as a cold-set binding agent to meat systems. For this reason, we have

studied three model systems: rehydrated plasma powder (PPW), meat batters (ME) and meat batters supplemented with rehydrated plasma powder (MEPPW) formulated with and without NaCl addition. A secondary aim was to establish the relationship between physico-chemical, textural and MRI parameters in order to evaluate the effect of plasma powder addition to meat systems.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Experimental design

A plasma powder (PP) prepared from porcine blood plasma with increased fibrinogen concentration (Roodink & Zuidweg, 2003) was used. This plasma powder is commercialized as plasma powder FG by Sonac Bv (Loenen, Netherlands).

Fresh pork (*M. biceps femoris*) was purchased from a local abattoir at 48 h post mortem.

Three model systems (Table 1) were considered: (1) rehydrated plasma powder (PPW), (2) meat batter (ME), and (3) meat batter with rehydrated plasma powder (MEPPW). The model systems were manufactured at three different times (February, May and October). In the three cases, each of the individual model systems was elaborated by triplicate (different pork pieces being used in each case). The model systems were elaborated in a refrigerated processing room at 10–12 °C under controlled conditions.

### 2.2. Preparation of the rehydrated plasma powder model system (PPW)

Plasma powder (PP) was mixed with distilled water (mixture PPW0) or NaCl (Panreac, Barcelona, Spain) aqueous solution to obtain a final salt concentration of 2% (mixture PPW2) and was shaken for 30 s. The proportion of plasma powder and liquid was 3/8, w/v (Table 1). The mixtures were prepared under vacuum conditions using a vertical cutter-mixer (Robot Coupe R 8 V.V., Vincennes Cedex, France) equipped with blend blades. The temperature of the process was maintained about 2 °C.

### 2.3. Preparation of meat batter model system (ME)

The visible fat and connective tissue was removed from the pork and was pre-cut into small portions. Then, the meat was chopped for 1 min at 1500 rpm in a vertical cutter-mixer (Robot Coupe R 8 V.V., Vincennes Cedex, France) equipped with a vacuum system. Following that, water or the NaCl aqueous solution (at  $0 \pm 1$  °C) was added to the chopped meat and mixed for 1 minute to obtain a homogeneous mixture. The process was performed while controlling the temperature, using thermocouples (Yokogawa Hokushin Electric YEW, Mod. 3087, Tokyo, Japan), to maintain the product at  $0 \pm 2$  °C. With this procedure, two different meat

**Table 1**

Elaboration procedure (components, addition order and proportion added) of the different model systems used.

System <sup>a</sup>	Mixture name <sup>a</sup>	Minced meat (g)	NaCl aqueous solution		Water (mL)	Plasma powder (g)	PPW0 <sup>a</sup> (g)
			NaCl % <sup>b</sup>	mL			
PPW	PPW0	0	0	0	72	27	0
	PPW2	0	2.75	72	0	27	0
ME	ME0	90	0	0	10	0	0
	ME2	90	20	10	0	0	0
MEPPW	MEPPW0	90	0	0	10	0	27
	MEPPW2	90	25	10	0	0	27

<sup>a</sup> PPW: plasma powder rehydrated with water (3/8, w/v; mixture named PPW0) or NaCl aqueous solution (3/8, w/v; mixture named PPW2); ME: meat batter without NaCl addition (ME0) and with 2% of NaCl (MEP2); MEPPW: meat batter with rehydrated plasma power without NaCl addition (MEPPW0) and with 2% of NaCl (MEPPW2).

<sup>b</sup> Percentage (w/v) of NaCl in aqueous solution.

batter mixtures were elaborated (Table 1): (a) meat batter with 0% salt (mixture named ME0) obtained when minced meat was mixed with water (9/1 w/v) and (b) meat batter with 2% NaCl (mixture ME2) prepared by adding a NaCl aqueous solution to ground meat. In this mixture, the ratio meat/salt solution was (9/1 w/v). The NaCl aqueous solution was prepared to achieve a 2% salt concentration in the meat batter mixture. A possible procedure to obtain the mixtures ME0 and ME2 is showed in Table 1.

#### 2.4. Preparation of meat batter with rehydrated plasma powder model system (MEPPW)

Two different types of mixtures of meat batter and rehydrated plasma powder (3/8, plasma powder/ liquid, w/v) were elaborated (Table 1): (a) meat batter with 0% salt and 6% plasma powder (MEPPW0 mixture) manufacture when ME0 was mixed with PPW0 (100/27, w/w) and (b) meat batter with about 6% PP and 2% NaCl (MEPPW2). This mixture was prepared by mixing minced meat, a NaCl aqueous solution and PPW0 (90/10/27, w/v/w). The NaCl aqueous solution was prepared to obtain a 2% of salt concentration in the final mixture. A possible procedure to obtain the mixtures MEPPW0 and MEPPW2 is showed in Table 1. These mixtures (MEPPW) were carefully prepared under vacuum condition for 1 minute using a vertical cutter-mixture equipped with blend blades at the lower speed (300 rpm). The ingredients were added in the following order: meat batter, water or NaCl aqueous solution and rehydrated plasma powder (Table 1). The temperature of the process did not exceed 2 °C.

The mixtures PPW0, PPW2, ME0, ME2, MEPPW0 and MEPPW2 were extended (thickness of 0.5 cm for physico-chemical and textural analysis and 1.5 cm for magnetic resonance imaging measurements) into circular plastic containers (diameter, 9 cm) and were immediately vacuum-packed in individual plastic bags (CRYOVAC) in a high vacuum machine (750/400 model, Vapta, SL, Spain). They were then stored for 72 h at 4 °C until analysis.

#### 2.5. Physico-chemical analysis

The protein (Kjeldhal nitrogen) and fat content of ME mixtures were determined using the methods of AOAC. (1995) and Bligh and Dyer, described by Hanson and Olley (1963), respectively. The pH from the three model systems (PPW, ME and MEPPW systems) was determined in a homogenate of the sample with distilled water (1:10) (w/v), using a Crison Digit-501 pH meter (Crison Instruments LTD, Barcelona, Spain). The moisture content in the three model systems was measured following the AOAC (1995) procedure (air-dry oven method).

Water activity ( $a_w$ ) was measured using a Decagon CX1 hygrometer (Decagon Devices Inc., Pullman, WA, USA) at 25 °C.

Water-holding capacity (WHC) was measured by using the Carver Press Method (Kauffman, Eikelenboom, van der Wal, Merkus, & Zaar, 1986). The meat sample (0.3 g) was placed on a piece of filter paper (Whatman No. 1, 125 mm), then placed between two plexiglass plates and subjected to a mechanical force of 345 kPa for 5 min. The WHC values were calculated as the percentage of water retained based on water content in the product before pressing. Four replicates of each sample were determined.

#### 2.6. Textural analysis

A texture profile analysis (TPA) and puncture test were performed at about 22 °C using a TA.XT2i SMS Stable Micro Systems Texture Analyser (Stable Microsystems Ltd., Surrey, England) with the *Texture Expert* program. For both textural analyses, four cylinders that were 0.5 cm in height and 2 cm in diameter of each sample were prepared.

##### 2.6.1. TPA analysis

A double compression cycle test was performed of up to 50% compression of the original portion height with an aluminium cylinder probe P/25. A time of 5 s was allowed to elapse between the two compression cycles. Force–time deformation curves were obtained with a 25 kg load cell applied at a cross-head speed of 2 mm s<sup>-1</sup>. The following parameters were quantified (Bourne, 1978; Santos, Ordoñez, Cambero, D'Arrigo, & Hoz, 2004): hardness (N), that is, maximum force required to compress the sample; springiness (cm), ability of the sample to recover its original form after deforming force was removed; adhesiveness (N s), area under the abscissa after the first compression; and cohesiveness, that is, the active work done under the second compression curve to that done under the first compression curve (dimensionless).

##### 2.6.2. Puncture test

Samples were penetrated to breaking-point with a 5 mm diameter plunger (model P/20). The cross-head speed was 0.2 mm s<sup>-1</sup>. The breaking force (N) was determined in the force deformation curves.

#### 2.7. Magnetic resonance imaging (MRI) analysis

All MRI measurements were performed according to Herrero et al. (2007). A Bruker BIOSPEC 47/40 spectrometer (Bruker GmbH, Ettlingen, Germany) operating at 4.7 T (200 MHz) equipped with a 12 cm diameter and which actively shielded imaging gradients capable of reaching 200 mT/m along all the axes was used.

Each of the samples for imaging were cut approximately 4 cm long, 3 cm wide and 1.5 cm thick (Herrero et al., 2007). The samples were placed in a homebuilt shaped surface coil with a dimension of 4 × 4 cm. A first global shimming was performed and then three scout spin-echo experiments in axial, sagittal and coronal direction were acquired to localize the slices in the desired place.

For measurements of  $T_2$ , separate images were acquired at ten echo times (TE = 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 ms). All other imaging parameters remained constant between images (NA = 1; TR = 3046.1 ms; MTX = 256 × 256; FOV = 4 × 4 cm; slice thickness = 1 mm; slice number = 10). The data were then fitted to a single exponential decay, according to the equation:

$$S(TE) = S_0(\exp(-TE/T_2)) \quad (1)$$

where  $S(TE)$  is the weighted image in  $T_2$ , TE is echo time and  $S_0$  is the image signal when TE is equal to zero.

For measurements of  $T_1$ , separate images were acquired at six recovery times (TR = 310, 510, 1210, 2010, 3010 and 6010 ms); all other imaging parameters remained constant between images (NA = 1; TE = 20 ms; MTX = 256 × 128, reconstructed 256 × 256; FOV = 4 × 4 cm; slice thickness = 1 mm; slice number = 8). The data are then fitted to an exponential equation:

$$S(TR) = S_0(1 - \exp(-TR/T_1)) \quad (2)$$

where  $S(TR)$  is the signal of the weighted image in  $T_1$ , TR is recovery time and  $S_0$  is the image signal when TR is equal to zero.

To measure the apparent diffusion coefficient (ADC), separate images were acquired at four diffusion weightings ( $b$  value = 62.8, 370.8, 1131.4, 2309.5 s mm<sup>-2</sup>). All other imaging parameters remained constant between images (NA = 1; TR = 2000 ms; TE = 75 ms;  $\Delta$  = 50 ms;  $\delta$  = 10 ms; MTX = 256 × 128, reconstructed 256 × 256; FOV = 4 × 4 cm; slice thickness = 1 mm, between slice gap of 0.5 mm; slice number = 5). For ADC the echo signal intensity is fitted to the equation:

$$ADC = \log(S/S_0)/b \quad (3)$$

where  $S$  is the signal weighted in diffusion, TE is echo time,  $S_0$  is the image signal when ADC is equal to zero and  $b$  is the value of diffusion weightings.

## 2.8. Statistical analysis

An individual mixture was the experimental unit for analysis of all data. The statistical analysis was carried out using a Statgraphics Plus version 5.0. Data were presented as the means and the standard deviation (SD) of each mixture. To check the normal distribution (90% confidence) of samples, the Shapiro–Wilks test was applied. When samples fitted the normal distribution, the one-way ANOVA analysis was performed. When samples did not fit the normal distribution, the Kruskal–Wallis test was used to test the null hypothesis that the medians of variable within each of the levels in the samples were the same. Both Duncañs test for multiple mean comparisons and the Pearson product moment correlation (R), using the Durbin–Watson statistic tests at 95%, of confidence level, were performed to determine the relationships between data from TPA, puncture test, physico-chemical analysis and MRI parameters.

In order to estimate the textural parameters using water holding capacity (WHC) and MRI values, the response surface methodology was used. The transformation of WHC and MRI values to coded units ( $X_1$  and  $X_2$ ) was carried out by applying the equation described by Van Ginkel, Sung, and Lay (2001). The expression used to obtain each coded unit ( $X_n$ ) was:

$$X_n = (x_n - x_n^0) / \Delta x_n$$

where  $X_n$  is the new standardized variable ( $X_1$  or  $X_2$ );  $x_n$  is the original variable (WHC or MRI values);  $x_n^0$  is the median of  $x_n$ .  $\Delta x_n$  is the step size, calculated as the length of the interval containing the values of  $x_n$  divided by the desirable number of units in the new scales. Notice that the number of units in the new scales can be arbitrarily chosen, as long as it is the same for both variables. The number of units of the new scales does not affect the estimation of the effect of the standardized variables on the response variable by regression.

A regression analysis was performed to estimate the response function as is shown below:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2$$

where  $Y$  is the predicted response (estimated textural parameters values),  $\beta_0$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$  and  $\beta_{12}$  are the coefficients estimated from regression. They represent the linear, quadratic and cross-product effects of  $X_1$  and  $X_2$  on the response.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Physico-chemical characteristics

The minced meat used to elaborate ME and MEPPW systems showed a uniform chemical composition with percentages of protein and fat about  $19 \pm 1$  and  $5 \pm 0.3$ , respectively (data not shown). The pH values, water content (water %), water activity ( $a_w$ ), and water holding capacity (WHC %) of the model systems are reported in Table 2.

The lowest ( $p < 0.05$ ) pH values (around 5.8) corresponded to the meat batter system (ME) and the highest (about 8.8) to the rehydrated plasma powder (PPW) system (Table 2). pH, ionic strength (by salt addition) and nonmeat ingredients addition are important factors which affect the gelation of the meat batters (Aguilera & Stanley, 1993; Chen, Xu, & Wang, 2007; DeFreitas, Sebranek, Olson, & Carr, 1997; Hongspabhas & Barbut, 1999; Regenstein, 1984). Modifying these parameters can change the microstructural and rheological properties of meat products (Aguilera & Stanley, 1993; Hongspabhas & Barbut, 1999). The pH was not significantly ( $p > 0.05$ ) changed by salt addition (Table 2). Similar results and pH values have been reported for meat batter using different cold-set agents (Herrero et al., 2007; Hongspabhas & Barbut, 1999; Ionescu, Aprodu, Daraba, & Porneala, 2008).

Meat batter system (ME) showed the highest  $a_w$  ( $p < 0.05$ ). In this system, the  $a_w$  decreased ( $p < 0.05$ ) when NaCl at 2% was added (mixture ME2). The PPW and MEPPW systems presented similar ( $p > 0.05$ )  $a_w$  values with a decrease ( $p < 0.05$ ) associated to salt addition. The addition of PPW to ME (MEPPW system) produced a decrease ( $p < 0.05$ ) on  $a_w$ . The PPW0 mixture showed the highest ( $p < 0.05$ ) WHC, whereas the ME0 and MEPPW0 mixtures presented similar ( $p > 0.05$ ) WHC values. The reduction of WHC in the PPW system compared to the PEPPW system might have been caused by interference of the plasma and meat components. A significant increase ( $p < 0.05$ ) in WHC was observed in the ME and MEPPW systems when NaCl at 2% was added. The salt addition caused the ME and MEPPW systems to show similar WHC to the PPW system. These results could be related to the myofibrillar protein solubilisation process because of the use of NaCl (Gordon & Barbut, 1992). It is possible that the opening of the  $\alpha$ -helix structure (by salt addition) promotes the protein–protein and protein–water interactions. The results obtained in the present work can be related with those reported by other authors using different cold-set binding systems and several procedures to manufacture restructured meat products. Several authors (Hongspabhas & Barbut, 1999), using whey protein isolate as cold-set agent, observed a decrease of WHC of the raw batters especially at  $<1.5\%$  salt. In a study of the combined effects of NaCl and  $\kappa$ -carrageenan (Hong, Ko, Choi, & Min, 2008), it was observed that decreasing the NaCl concentration, reduced the WHC of the restructured pork.

### 3.2. Textural properties

The textural properties of the model systems are presented in Figs. 1 and 2. Fig. 1 shows the different textural behaviour of the ME system supplemented with PPW (MEPPW system) without (a) and with (b) NaCl addition. The textural profiles of Fig. 2 showed the effect of NaCl addition in the all model systems (PPW, ME and MEPPW). The PPW system (Fig. 2a) showed behaviour as plastic fluid. Both mixtures, with and without NaCl (PPW2 and PPW0) showed the lowest ( $p < 0.05$ ) hardness (about 1.5 N), adhesiveness (values of 0.04 N s) and springiness (about 0.2 cm), and the highest ( $p < 0.05$ ) cohesiveness (values about 0.65). The

**Table 2**

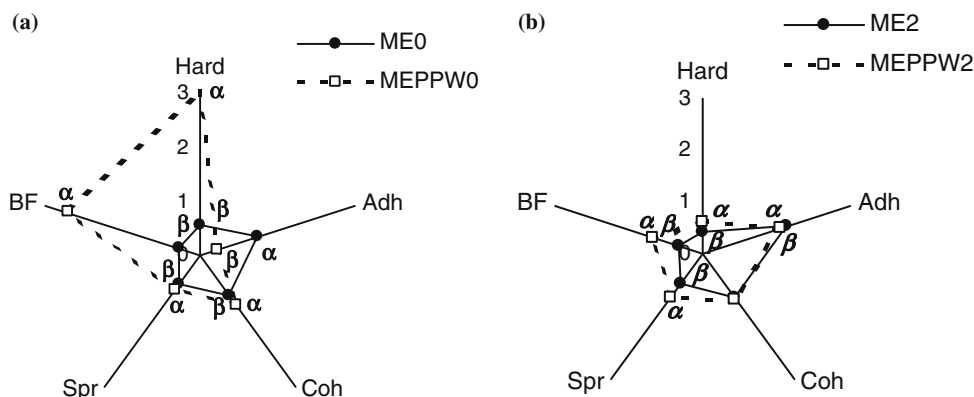
pH values, water content (%), water activity ( $a_w$ ) and water holding capacity (WHC %), calculated as the percentage of water retained based on water content in the product) of the different model systems analysed: rehydrated plasma powder (PPW system), meat emulsion (ME system), and meat batter with rehydrated plasma powder (MEPPW system), without and with NaCl addition.

NaCl (%) <sup>A</sup>	System		
	PPW	ME	MEPPW
<b>pH</b>			
0	8.80 $\pm$ 0.02 a, $\alpha$	5.76 $\pm$ 0.01 a, $\gamma$	5.98 $\pm$ 0.02 a, $\beta$
2	8.86 $\pm$ 0.04 a, $\alpha$	5.77 $\pm$ 0.01 a, $\gamma$	5.99 $\pm$ 0.01 a, $\beta$
<b>Water content (%)</b>			
0	73.7 $\pm$ 0.7 a, $\beta$	75.8 $\pm$ 0.4 a, $\alpha$	75.5 $\pm$ 0.3 a, $\alpha$
2	73.4 $\pm$ 0.3 a, $\beta$	76.0 $\pm$ 0.8 a, $\alpha$	75.2 $\pm$ 0.5 a, $\alpha$
<b><math>a_w</math></b>			
0	0.969 $\pm$ 0.001 a, $\beta$	0.992 $\pm$ 0.001 a, $\alpha$	0.972 $\pm$ 0.002 a, $\beta$
2	0.962 $\pm$ 0.002 b, $\gamma$	0.985 $\pm$ 0.002 b, $\alpha$	0.966 $\pm$ 0.001 b, $\beta$
<b>WHC (%)</b>			
0	98.4 $\pm$ 0.3 a, $\alpha$	96.4 $\pm$ 0.3 b, $\beta$	95.7 $\pm$ 1.0 b, $\beta$
2	98.8 $\pm$ 0.5 a, $\alpha$	98.4 $\pm$ 0.2 a, $\alpha$	98.9 $\pm$ 0.1 a, $\alpha$

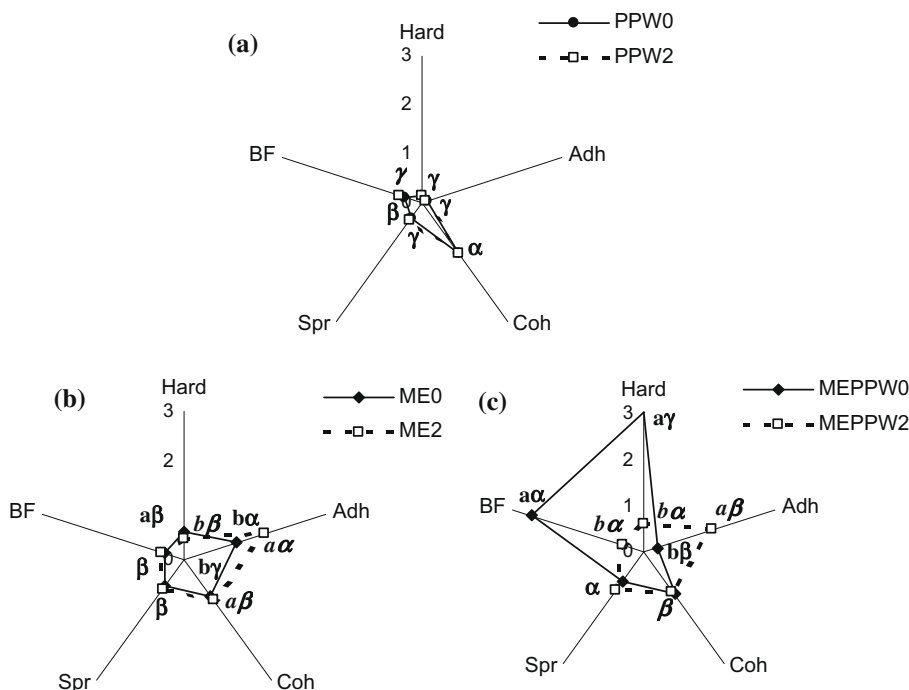
a, b: Different letters in a column for the same physico-chemical characteristics indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

$\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ : Different letters in the same row indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

<sup>A</sup> As indicated in Table 1, the model systems PPW, ME and MEPPW, without (0%) and with (2%) NaCl addition, correspond to the mixtures named PPW0, PPW2, ME0, ME2, MEPPW0 and MEPPW2, respectively.



**Fig. 1.** Textural behaviour [hardness (N), adhesiveness (Ns), cohesiveness (adimensional), springiness (cm) and breaking Strength ( $\text{N cm}^{-2}$ )]\* of the meat batter (ME) and meat batter supplemented with rehydrated plasma powder (MEPPW) systems without (a) and with 2% of NaCl addition (b). \*Hard (Hardness  $\times 10^{-1}$ ), Adh (Adhesiveness  $\times -1$ ), Coh (Cohesiveness  $\times 2$ ), Spr (Springiness  $\times 2$ ) and BS (Breaking Strength).  $\alpha$ ,  $\beta$ : Different letters in the same textural parameter of the model systems without NaCl indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).  $\alpha$ ,  $\beta$ : Different letters in the same textural parameter of the model systems with 2% NaCl indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 2.** Textural behaviour [hardness (N), adhesiveness (Ns), cohesiveness (adimensional), springiness (cm) and breaking strength ( $\text{N cm}^{-2}$ )]\* of model systems: (a) rehydrated plasma powder (PPW), (b) meat batter (ME) and (c) meat batter with rehydrated plasma powder (MEPPW), without (0) and with (2%) NaCl addition. \*Hard (Hardness  $\times 10^{-1}$ ), Adh (Adhesiveness  $\times -1$ ), Coh (Cohesiveness  $\times 2$ ), Spr (Springiness  $\times 2$ ) and BS (Breaking Strength). a, b: In each model system, different letters in the same textural parameter indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) as a function of NaCl addition.  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ : In all model systems without NaCl (PPW0, ME0 and MEPPW0), different letters in the same textural parameter indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ : In all model systems with NaCl (PPW2, ME2 and MEPPW2), different letters in the same textural parameter indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

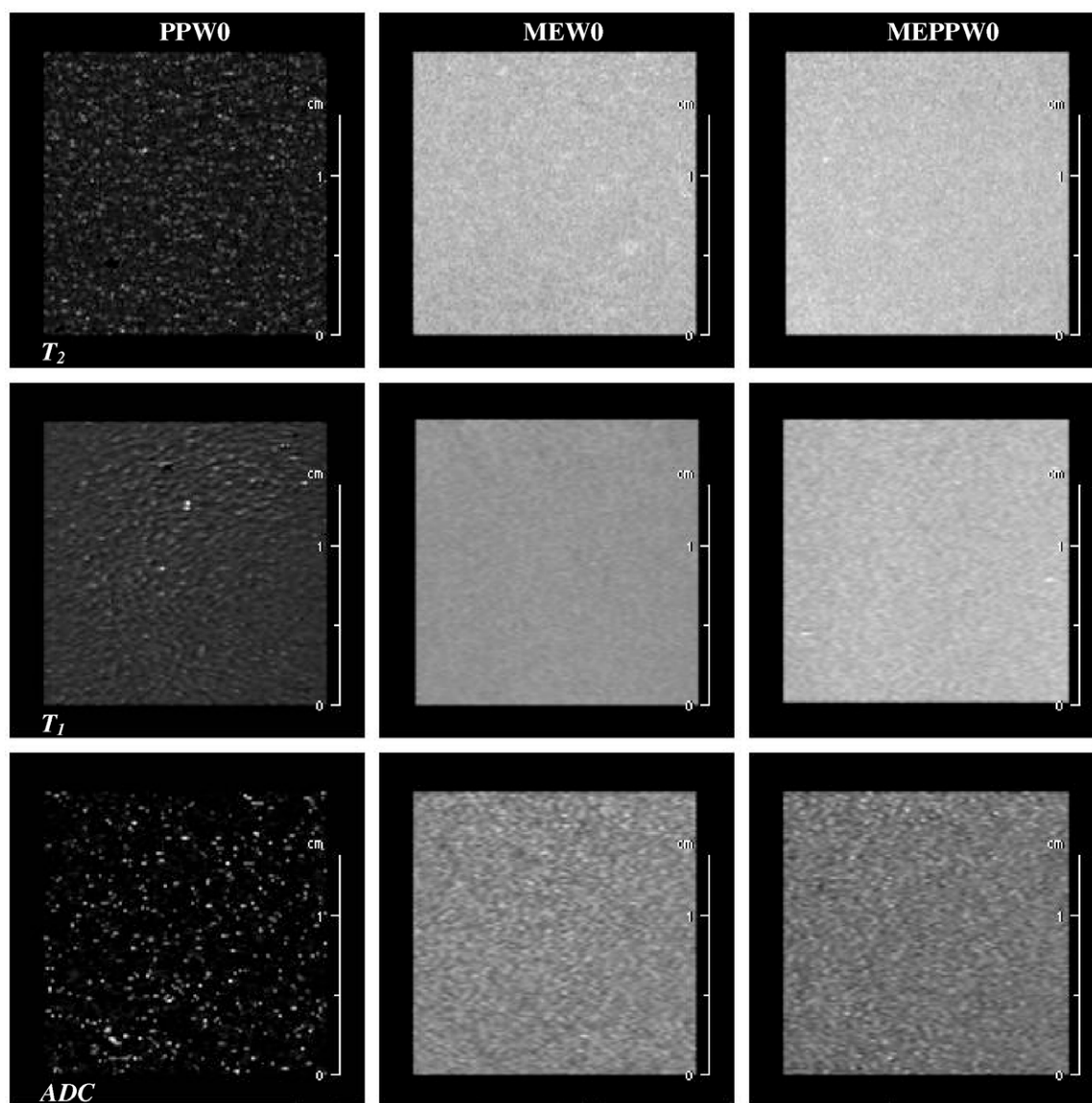
ME systems (Fig. 2b) could be considered a pseudo plastic fluid. This system showed the highest adhesiveness (between  $-1.14$  and  $-1.70$  N s for unsalted and salted mixtures, respectively) and the lowest ( $p < 0.05$ ) cohesiveness when salt was not added ( $0.46$  for ME0 mixture). The highest ( $p < 0.05$ ) hardness and springiness corresponded to the MEPPW system, independently of the NaCl concentration (Fig. 2c).

The MEPPW0 mixture (Figs. 1a and 2c) showed the highest ( $p < 0.05$ ) breaking force (BF). However, the BF of MEPPW system was affected by salt addition (Figs. 1 and 2c), causing a marked ( $p < 0.05$ ) decrease ( $2.61$  N for MEPPW0 versus  $0.92$  N for MEPPW2). Nevertheless, the MEPPW mixtures (MEPPW0 and

MEPPW2) showed a higher BF than the PPW and ME systems (Figs. 1 and 2). In the PPW and ME systems, a slight increase in BF ( $0.40$ – $0.44$  N for PPW0 and ME0 versus  $0.49$ – $0.51$  N for PPW2 and ME2) were observed when salt was added (Fig. 2a and b).

In the ME system (Fig. 2b), the NaCl addition decreased the hardness ( $5.7$  for ME0 versus  $4.3$  for ME2,  $p < 0.05$ ) while it increased the cohesiveness ( $0.46$  for ME0 versus  $0.55$  for ME2,  $p < 0.05$ ). The salt addition to ME did not show a significant ( $p > 0.05$ ) effect on the springiness (values about  $0.35$  cm for ME0 and ME2). In contrast, the salt addition to the MEPPW system (Figs. 1 and 2c) showed a significant increase of springiness ( $0.39$  for MEPPW0 versus  $0.51$  cm for MEPPW2,  $p < 0.05$ ). The changes in





**Fig. 3.** Representative Magnetic Resonance Imaging (MRI) maps of  $T_2$ ,  $T_1$ , and ADC in mixtures of rehydrated plasma powder (PPW0), meat batter (MEW0) and meat batter supplemented with plasma powder (MEPPW0) without NaCl addition.

the ME system textural parameters (hardness and cohesiveness) associated to salt addition (ME0 versus ME2) could be related to the role played by the NaCl in the dispersion/solubilisation of myofibrillar proteins during meat batter formation. It is well known that the addition of NaCl to ground meat favours the extraction of myofibrillar proteins (Brondum et al., 2000; Whiting, 1987; Whiting, 1988). Only the ME2 mixture was elaborated with the ionic strengths necessary to keep myosin/actomyosin dispersed. The ionic strengths (greater than 0.3 M) during batter formation prevent excessive protein–protein interaction. The meat batter (with salt solution added) can be described as a high viscosity protein sol with suspended fat particles (Whiting, 1988). Chen et al. (2007) did research on the thermal transition temperature of meat with and without NaCl (2.5%) and reported that the salt addition caused a destabilizing effect on the meat protein. The myofibrillar proteins in the ME0 mixture (without salt) would thus present their native configuration. Structural changes by NaCl addition should be reflected in the rheological properties of the meat batter system (ME).

The high values of hardness, springiness (for the MEPPW0 and MEPPW2 mixtures) and BF (only for the MEPPW0 mixture) of the MEPPW versus the PPW and ME systems (Figs. 1 and 2) suggest that molecular interactions may have occurred; this results in a gel structure formation because of the addition of the rehydrated plasma powder to the meat batter. In this sense, the fact that the addition of fibrinogen and thrombin to meat batter increases textural parameter values such as hardness and springiness (Herrero et al., 2007) has been described. Different textural results have been found in the scientific literature on the effects of blood plasma proteins in heat-induced gelation of meat products. Some authors indicated that the addition of plasma protein increased the mechanical properties of cooked meat products (Seideman, Smith, Carpenter, & Dill, 1979; Suter, Sustek, Dill, Marshall, & Carpenter, 1976). Others found that high plasma protein contents favoured the formation of harder and chewier structures (Cofrades, Guerra, Carballo, Fernandez-Martin, & Jimenez-Colmenero, 2000) on bologna sausage properties. On the other hand, no differences in hardness or cohesiveness were detected in ground beef patties

containing 1.5–3.5% plasma proteins (Guzmán, Mcmillin, Bidner, Dugas-Sims, & Godber, 1995).

Textural results shown in Fig. 1 indicate the great potential of PPW as a cold-set binding agent to give high mechanical stability to different meat products because this system modifies (overall in the unsalted mixture) the textural properties of meat batter (Fig. 1).

In both the ME and MEPPW systems, significant differences ( $p < 0.05$ ) in hardness, adhesiveness and cohesiveness as a function of the addition of NaCl (Figs. 1 and 2c) were found. The increase of adhesiveness ( $-0.30$  for MEPPW0 versus  $-1.57$  N s for MEPPW2) and the decrease of hardness ( $30.3$  for MEPPW0 versus  $6.2$  N for MEPPW2) and cohesiveness ( $0.6$  for MEPPW0 versus  $0.4$  for MEPPW2) as a result of the addition of salt (Figs. 1 and 2c) in the meat system with plasma powder (MEPPW) could be due to the fact that NaCl limited the formation of a gel structure. These results could be related with the findings of several authors (Papi et al., 2005; Standeven, Ariëns, & Grant, 2005; Vindigni & Di Cera, 1996) on fibrin polymerisation because the plasma powder used in their work also increased the fibrinogen concentration. These authors have identified the role of chloride ions as a basic physiological modulator of

fibrin polymerization, and in the formation of fibrin gel. They reported that chloride ions specifically bind to the fibrin fibres and oppose the lateral aggregation of protofibrils, resulting in thinner fibres and impeding fibrin polymerisation and formation of the gel or clot three-dimensional network. Moreover, Raman spectroscopy analyses have shown that the hydrophobic interactions between protein chains are increased by salt addition in meat batter systems (Herrero et al., 2009). Because of this, when salt was added, there would be less myofibrillar protein chains to be bound with the rehydrated plasma powder components. Therefore, there would be a three-dimensional network limitation which could restrict the formation of a gel matrix. Together, all of these facts could explain why the MEPPW mixture without NaCl (MEPPW0) had higher mechanical stability (hardness, cohesiveness and breaking force) than those systems with salt addition (MEPPW2).

### 3.3. Magnetic resonance imaging (MRI) analysis

An example of  $T_2$ ,  $T_1$  and ADC maps obtained by the MRI technique of PPW, ME and MEPPW model systems is presented in Fig. 3 (without NaCl addition) and Fig. 4 (with 2% of NaCl). Regard-

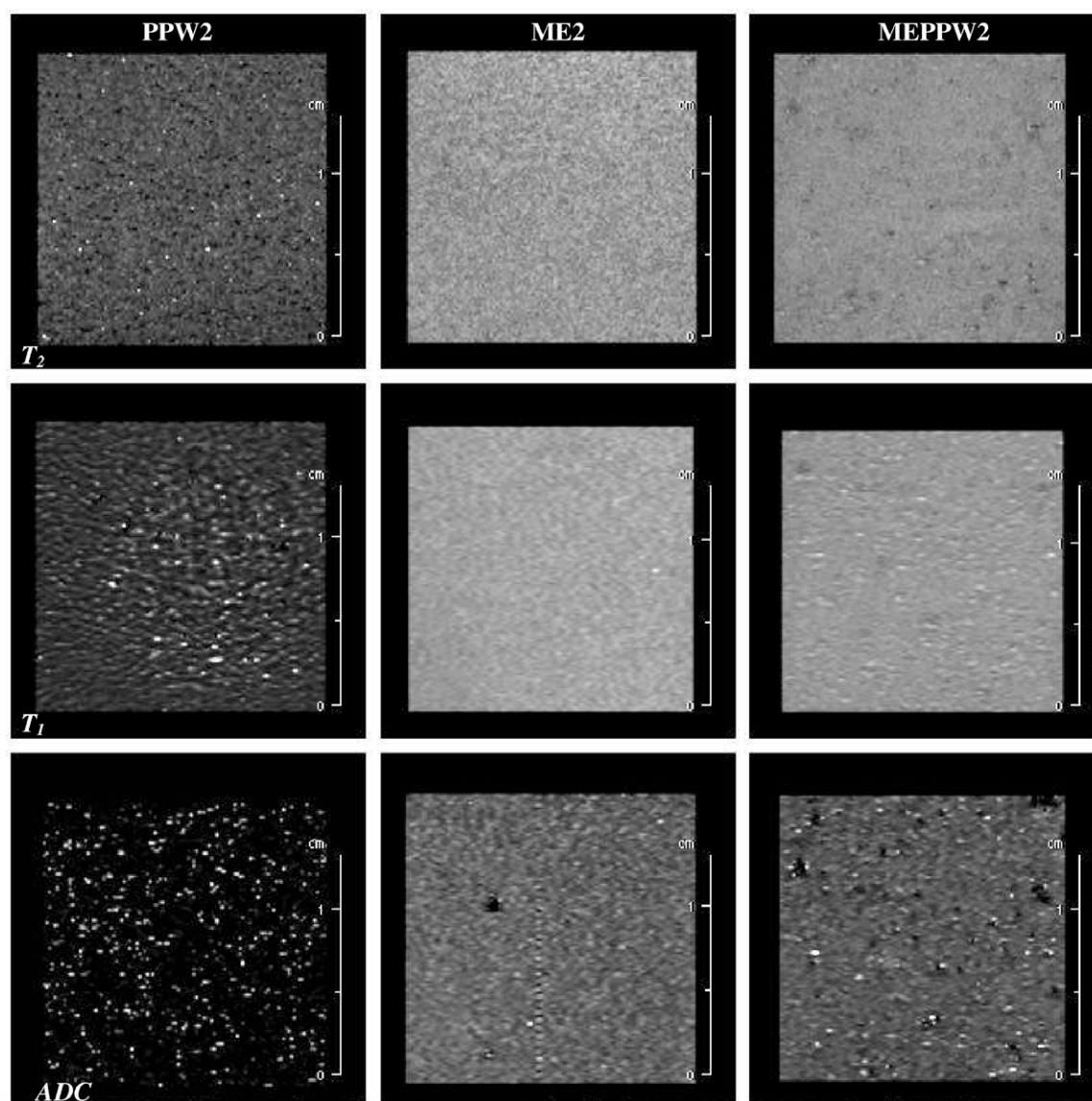


Fig. 4. Representative magnetic resonance imaging (MRI) maps of  $T_2$ ,  $T_1$  and ADC in mixtures of rehydrated plasma powder (PPW0), meat batter (ME0) and meat batter supplemented with plasma powder (MEPPW0) with 2% of NaCl addition.

less of their weighting ( $T_2$ ,  $T_1$  or diffusion), all images displayed good signal homogeneity across the surface. The differences in map signal intensity of the three systems allow the highest  $T_2$  values to be attributed to the PPW0 mixture. The highest signal intensity for  $T_1$  and ADC was observed for the MEPPW0 mixture. Table 3 shows the mean values of  $T_2$ ,  $T_1$  and ADC parameters for model systems, both salted and unsalted.

### 3.3.1. Transverse or spin–spin relaxation time

Transverse relaxation time ( $T_2$ ) is particularly sensitive to the porosity of the sample matrix. In principle, longer  $T_2$  times correspond to large pores or spaces (pools) in the sample matrix (Simpson, Grant, Blackband, & Constantinidis, 2003). The  $T_2$  parameter is mainly correlated with the tissue bulk water content and, therefore, changes in total water content and the degree of binding will result in modifications of  $T_2$  values (Boulby & Rugg-Gunn, 2003). Table 3 shows the  $T_2$  values of the mixtures analysed. The PPW0 mixture presented the highest ( $p < 0.05$ )  $T_2$  values and, therefore, the highest bulk water content. These  $T_2$  results indicate that the water rehydrated plasma powder (PPW0) probably formed a matrix constituted by big spaces filled with bulk water. In this system (PPW), a great significant decrease ( $p < 0.05$ ) of  $T_2$  with the addition of NaCl (mixture PPW2) has been observed (Table 3). This fact is probably due to the NaCl action because it produces changes in the protein structure giving rise to a closer saline solution rehydrated matrix associated to smaller pores and less bulk water. These results could be related with a more abundant presence of aliphatic residue exposures upon addition of NaCl to plasma proteins (Herrero et al., 2009).

Significant differences ( $p < 0.05$ ) were found between  $T_2$  values of PPW0 and those of mixtures ME0 and MEPPW0 ( $T_2$  values of ME0 and MEPPW0 mixtures were about half of those in PPW0). However, when NaCl was added, the  $T_2$  values of the PPW system (PPW2 mixture) were lower ( $p < 0.05$ ) than those of mixtures ME2 and MEPPW2, probably because of the changes in the PPW system previously mentioned (the NaCl addition produces a decrease of bulk water). An increase ( $p < 0.05$ ) of  $T_2$  values when salt is added to the meat batter system ( $T_2$  ME0 versus  $T_2$  ME2) was observed. These results may be because the addition of NaCl to meat batter causes changes in the conformation and stability of meat proteins characterized by an increase of the myofibrillar protein solubility and the opening of the structure (Gordon & Barbut, 1992). These facts could increase the bulk water content and  $T_2$  values (Table 3). In myofibrillar proteins extracted from porcine muscle an increase in  $T_2$  relaxation times obtained by low-field nuclear magnetic resonance (NMR) with increasing ionic strength by addition of NaCl (Bertram, Kristensen, & Andersen, 2004) has been reported.

An increase ( $p < 0.05$ ) of  $T_2$  values when plasma powder without salt is added to the meat batter system ( $T_2$  ME0 versus  $T_2$  MEPPW0) was observed. This fact could be associated with the results described by Herrero et al. (2009) when applying Raman spectroscopy to meat systems. This analysis showed that the addition of plasma powder to meat systems changed the protein structure with increases of turns and unordered structure and hydrophobic interactions (Herrero et al., 2009). These protein structural changes could produce modifications in protein–water and protein–protein interactions thereby increasing the  $T_2$  value.

On the other hand, MEPPW0 showed the highest hardness, springiness and breaking force (Fig. 1). Some authors have reported that  $T_2$  is influenced by the pore size of the material in which water is examined (As & Lens, 2001). An increase in relaxation time  $T_2$  by effect of the addition of fibrinogen and thrombin to meat systems has been previously observed (Herrero et al., 2007). This increase in  $T_2$  values was associated with the presence of fibrin and the formation of a three-dimensional network with large pores (Herrero et al., 2007). The increase ( $p < 0.05$ ) of the relaxation time  $T_2$  asso-

ciated with the addition of plasma powder to meat batter (MEPPW0 mixture) could be associated to a similar cold-set gelation process.

### 3.3.2. Longitudinal or spin–lattice relaxation time

The longitudinal relaxation time ( $T_1$ ) is a measure of molecule mobility (particularly water molecules) and hence the binding of water molecules, mainly at macromolecules. Free water presents a high  $T_1$  because of its mobility; when water is bound to macromolecules there is a loss of mobility with easier energy release and a decrease in the  $T_1$  value. These relaxation time values are dependent on the neighbouring molecules to water, when water is close to other macromolecules such as proteins,  $T_1$  values decrease (Gowland & Stevenson, 2003).

The PPW system (PPW0 and PPW2 mixtures) showed the lowest ( $p < 0.05$ )  $T_1$  values. The low  $T_1$  in contrast with the high  $T_2$  values of the PPW0 mixture may be due to the presence of numerous small particles (with high binding water capacity, which decrease the water mobility originating low  $T_1$ ) in the matrix in combination with large spaces with bulk water (high  $T_2$ ). In agreement with these data, the PPW0 mixture showed high WHC (Table 2).

A significant ( $p < 0.05$ ) increase in the transverse relaxation time  $T_1$  of the MEPPW0 mixture was observed when compared to the ME0 mixture without plasma powder. This increase indicated that plasma powder addition to meat batter produces an increase in the mobility of the water in the MEPPW0 mixture. These results could suggest that the water presents a freer distribution due to the gelification matrix produced by the addition of plasma powder to the meat system. Previously, a similar increase has been described in the  $T_1$  values of meat systems supplemented with fibrinogen and thrombin as cold-set binding agents (Herrero et al., 2007).

Significant ( $p < 0.05$ ) variations of  $T_1$  were observed in relation with NaCl addition (Table 3). However, this variation in  $T_1$  values is different for each system. In the ME system, the addition of NaCl produced a significant increase ( $p < 0.05$ ) in relaxation time  $T_1$ . These results are in agreement with Gordon and Barbut (1992), who indicated that the addition of NaCl to meat systems causes a decrease in the presence of water in the hydration layers and, because of this, the water acquires more mobility (higher  $T_1$ ). In consideration of this fact, other authors (Herrero et al., 2009) using Raman spectroscopy results have indicated an increase in hydrophobic residue exposure in meat systems by the addition of salt. In contrast, in the MEPPW and PPW systems, a significant decrease ( $p < 0.05$ ) of  $T_1$  by the addition of salt was observed (Table 3), which indicated a concomitant decrease of water mobility. The decrease in relaxation time  $T_1$  in the PPW system associated to NaCl addition could be attributed to changes in the structure of plasma proteins when they were rehydrated with an aqueous saline solution, which is characterized by a higher number of aliphatic residue exposures (Herrero et al., 2009), thus resulting in a closer rehydrated matrix with smaller pores (low  $T_2$ ). The plasma proteins could be surrounded and bound with water, consequently decreasing their mobility (lower  $T_1$  values), while in PPW0 mixture, the water were freer in bigger spaces (associated to higher  $T_1$  values).

The  $T_1$  decrease ( $p < 0.05$ ) in the MEPPW2 mixtures could be due to a higher presence and interactions of hydrophobic residues from plasma and meat proteins. This fact is correlated with a previous work of Raman spectroscopy (Herrero et al., 2009) in which consists of a description of the effect of how NaCl increases the intensities of the tyrosyl doublet ratio ( $I_{850/830} \text{ cm}^{-1}$ ) and the CH stretching band ( $2935 \text{ cm}^{-1}$ ) of the plasma powder and meat batter systems; this is related to an increase of hydrophobic residue exposures. In addition, an intensity decrease in the CH bending ( $1450 \text{ cm}^{-1}$ ) and stretching ( $2935 \text{ cm}^{-1}$ ) bands (related to an in-



**Table 3**

Magnetic resonance image (MRI) parameters of the different model systems analysed: rehydrated plasma powder (PPW system), meat batter (ME system), and meat batter with rehydrated plasma powder (MEPPW system), without and with NaCl addition.

NaCl (%) <sup>A</sup>	System		
	PPW	ME	MEPPW
$T_2$ (ms)			
0	100.7 ± 9.9 a,α	54.8 ± 0.5 b,γ	58.8 ± 1.2 a,β
2	49.2 ± 2.9 b,β	63.4 ± 1.3 a,α	60.0 ± 2.1 a,α
$T_1$ (ms)			
0	1501 ± 46 a,γ	1665 ± 37 b,β	2285 ± 41 a,α
2	1367 ± 53 b,γ	2071 ± 55 a,α	1853 ± 27 b,β
ADC (mm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )10 <sup>-3</sup>			
0	0.28 ± 0.03 a,γ	0.91 ± 0.01 b,β	1.01 ± 0.04 a,α
2	0.26 ± 0.05 a,γ	1.02 ± 0.02 a,α	0.82 ± 0.03 b,β

a, b: Different letters in a column for the same MIR parameter indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

α, β, γ: Different letters in the same row indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

$T_1$  = longitudinal relaxation time (ms).

$T_2$  = transversal relaxation time (ms).

ADC = apparent diffusion coefficient.

<sup>A</sup> As indicated in Table 1, the model systems PPW, ME and MEPPW, without (0%) and with (2%) NaCl addition, correspond to the mixtures named PPW0, PPW2, ME0, ME2, MEPPW0 and MEPPW2, respectively.

crease in hydrophobic interactions) associated with plasma powder addition to meat batter was observed (Herrero et al., 2009). In this matrix (plasma and meat proteins), the water could coat the macromolecular structure decreasing water mobility (lower  $T_1$  values).

When data of Figs. 1 and 2 and Table 3 were compared by the Pearson product moment correlation ( $R$ ), it was found that hardness ( $R = 0.762$ ,  $p < 0.005$ ), springiness ( $R = 0.682$ ,  $p < 0.05$ ) and breaking force ( $R = 0.691$ ,  $p < 0.05$ ) were positively correlated with  $T_1$  relaxation times (data not shown). These facts indicate that hardness, springiness and breaking force increase when the water molecule mobility in the systems analysed increase. As it has been stated before, the water mobility increase may be related with protein structural changes of the model systems. In this way, an increase of hardness and springiness accompanied by an increase of turn and unordered structure content and hydrophobic interactions were observed upon addition of rehydrated plasma powder to meat batter systems (Herrero et al., 2009). A significant negative

correlation was obtained between  $T_1$  values and the WHC of the different systems ( $R = -0.53$ ,  $p < 0.05$ ), which can be explained by the fact that an increase in water freedom implies a higher  $T_1$  value. For a better understanding of these relations, the estimated response surface for the meat system hardness (with and without plasma powder and salt addition) using the WHC (in coded units,  $X_1$ ) and the  $T_1$  relaxation times (in coded values,  $X_2$ ) is shown in Fig. 5. The median of  $X_1$  and  $X_2$  was 96.1 and 1763.6 and the step size was equal to 1 and 200, respectively. The regression equation obtained was:

$$\text{Hardness} = 2.96 - 0.57X_1 + 2.62X_2 + 0.53X_1^2 + 4.21X_2^2 - 1.86X_1X_2$$

Fig. 5 shows that hardness was affected by WHC,  $T_1$  and their interaction. According to the results, the interaction of  $T_1$  and WHC had some influence on the hardness of the meat model system. Nevertheless, in general it is possible to assume that, at the same WHC, hardness increases with increasing  $T_1$  values and, at the same  $T_1$ , a decrease in WHC leads to an increase in hardness. At lower  $T_1$  values, hardness decreases with decreasing WHC.

### 3.3.3. Apparent diffusion coefficient

The apparent diffusion coefficient (ADC) is a measure of the average translational motion of water molecules. Water in a free environment can diffuse easily in all directions. The water molecules are compartmented in biological tissues. Some barriers (such as cell walls and large chain proteins) reduce the ability of water to diffuse and the destruction of these biological barriers is reflected by an increase in the ADC (Wheeler-Kingshott et al., 2003).

Table 3 shows the ADC values of the model systems. The PPW system showed the lowest ( $p < 0.05$ ) ADC values, independently of salt content. The ME0 mixture showed lower ( $p < 0.05$ ) ADC than the MEPPW0 mixture which could be attributed to the fact that the matrix formed by the addition of this gelifying agent (plasma powder) increases the water diffusion capacity. In contrast, the presence of salt produces a significant increase ( $p < 0.05$ ) of ADC values in the ME system and a decrease ( $p < 0.05$ ) in the MEPPW system. Therefore, the water molecules are more compartmented in MEPPW2 than ME2 mixtures. These results are in concordance with those found in  $T_1$  values by the addition of salt. The water mobility (ADC) decrease with the presence of salt in the MEPPW system, may be attributed to similar protein structural changes such as those previously mentioned related with the  $T_2$  and  $T_1$  behaviour and the protein (from plasma powder and meat)

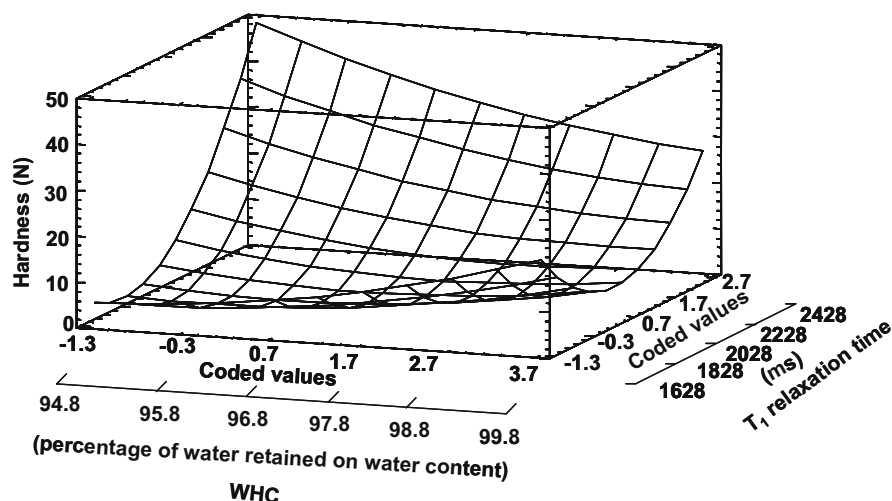
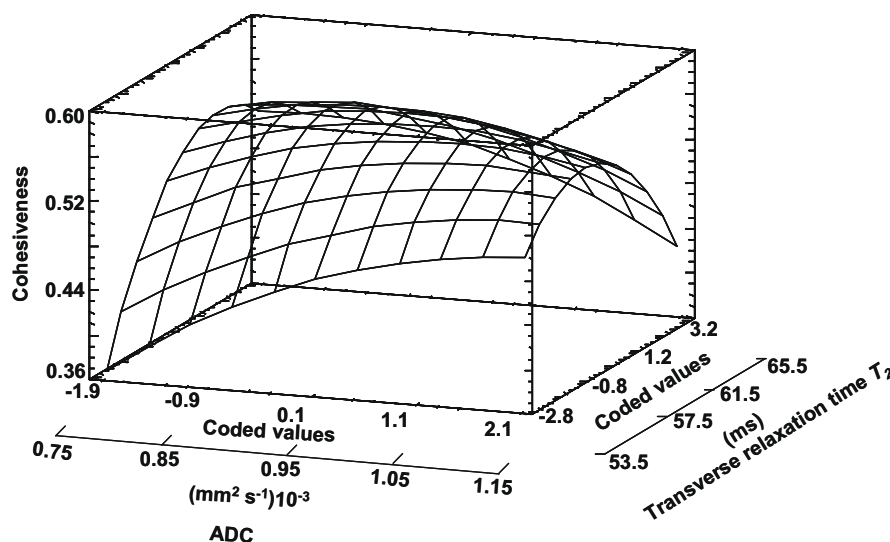


Fig. 5. Response surface plot showing the relation of the longitudinal relaxation times  $T_1$  and water holding capacity (WHC) on the hardness of meat batter systems added with or without rehydrated plasma powder and NaCl.





**Fig. 6.** Response surface plot showing the relation of the apparent diffusion coefficient (ADC) and the transverse relaxation times  $T_2$  on the cohesiveness of meat batter systems added with or without rehydrated plasma powder and NaCl.

changes observed by Raman spectroscopy (Herrero et al., 2009). A positive significant correlation between springiness ( $R = 0.734$ ,  $p < 0.05$ ) and ADC values was observed. In contrast, cohesiveness ( $R = -0.821$ ,  $p < 0.005$ ) was negatively correlated with ADC (data not shown). It is reasonable to assume that the higher the water compartmentalization, the higher springiness is. Low cohesiveness is related to water unrestricted in the matrix of the system analysed. The cohesiveness of meat systems (with and without plasma powder and salt addition) could be estimated using the ADC (in coded units,  $X_1$ ) and the transverse relaxation time  $T_2$  (in coded values,  $X_2$ ) MRI parameters by a polynomial curve fitting. The median of  $X_1$  and  $X_2$  was 0.939 and 59.09 and the step size was equal to 0.1 and 2, respectively. The regression equation obtained was:

$$\text{Cohesiveness} = 0.56 + 0.008X_1 + 0.011X_2 - 0.008X_1^2 - 0.009X_2^2 - 0.009X_1X_2$$

The regression results are plotted in Fig. 6. This figure shows a higher effect of the  $T_2$  (associated to water binding) than of ADC (associated to the ability of water to diffuse) and their interaction on the cohesiveness of the meat system with and without plasma powder addition and salted and unsalted. The response surface of cohesiveness shows a clear peak, suggesting that the maximum cohesiveness (around 0.57) corresponds to a meat system with  $T_2$  and ADC values of about 1800 and 0.88, respectively.

#### 4. Conclusions

The addition of rehydrated plasma powder changes the physico-chemical, textural and structural properties of meat systems. The textural changes produced by the addition of plasma powder indicate that this cold-set binding agent gives high mechanical stability to a meat system (mainly in the unsalted systems), which produces an increase in hardness, cohesiveness, springiness and breaking force. Meat systems with plasma powder present structures with larger pores (associated to high  $T_2$ ), more water mobility (high  $T_1$ ) and more water translational motion (high ADC) than meat batters without this binding agent. When salt is added to a meat system with plasma powder, physico-chemical, textural and structural properties are also modified. The addition of salt produces a decrease of hardness and breaking force and increases

the adhesiveness. The salt addition in a meat system with plasma powder is also associated to magnetic resonance image (MRI) parameter modifications, with higher  $T_2$  (indicating an increase of the porosity of the matrix), lower  $T_1$  (associated to more binding water) and lower ADC (more water compartmentalization and less ability for water diffusion) than unsalted systems.

The response surface analysis establishes the effects of water holding capacity,  $T_1$  and their interaction on the meat system hardness (with and without plasma powder addition, and unsalted and salted) as well as the correlation of the cohesiveness with the MRI parameters ADC and  $T_2$ .

The changes established in the structure and textural properties of a meat system by the addition of plasma powder and NaCl could help to optimize the meat product manufacture conditions with this cold-set binding agent.

#### Acknowledgements

The authors are grateful for the financial support of Projects AGL04-6773 and CARNISENUSA (CSD2007-00016), included in the CONSOLIDER-INGENIO 2010 issue (Ministerio de Educación y Ciencia). The Comunidad de Madrid has supported the projects CCG07-UCM/AGR-2640 and "TEMINYSA" (S-0505/AGR-0314). A.M. Herrero was supported by a contract from the JAS-postdoctoral (CSIC) Program.

#### References

- Aguilera, J. M., & Stanley, D. W. (1993). The microstructure of food protein assemblies. *Food Reviews International*, 9, 527–550.
- AOAC (1995). *Official methods of analysis* (16th ed.). Washington, DC, USA: Association of Official Analytical Chemists, Inc.
- As, H. V., & Lens, P. (2001). Use of  $^1\text{H}$ -NMR to study transport processes in porous biosystems. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 26, 43–52.
- Bertram, H. C., & Andersen, H. J. (2004). Applications of NMR in meat science. *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, 53, 157–202.
- Bertram, H. C., Kristensen, M., & Andersen, H. J. (2004). Functionality of myofibrillar proteins as affected by pH, ionic strength and heat treatment – A low-field NMR study. *Meat Science*, 68, 249–256.
- Bertram, H. C., Whittaker, A. K., Shorthose, W. R., Andersen, H. J., & Karlsson, A. H. (2004). Water characteristics in cooked beef as influenced by ageing and high-pressure treatment – An NMR micro imaging study. *Meat Science*, 66, 301–306.
- Boles, J. A., & Shand, P. J. (1998). Effect of comminution method and raw binder system in restructured beef. *Meat Science*, 49, 297–307.
- Boles, J. A., & Shand, P. J. (1999). Effects of raw binder system, meat cut and prior freezing on restructured beef. *Meat Science*, 53, 233–239.

- Bonny, J. M., Laurent, W., Labas, R., Taylor, R., Berge, P., & Renou, J. P. (2000). Magnetic resonance imaging of connective tissue: A non-destructive method for characterising muscle structure. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 337–341.
- Boulby, P. A., & Rugg-Gunn, F. (2003). T<sub>2</sub>: The transverse relaxation time. In P. Tofts (Ed.), *Quantitative MRI of the brain. Measuring changes caused by disease* (pp. 143–173). West Sussex, England: John Wiley & Sons.
- Bourne, M. C. (1978). Texture profile analysis. *Food Technology*, 32, 62–66.
- Brondum, J., Munck, L., Henckel, P., Karlsson, A., Tornberg, E., & Engelsen, S. B. (2000). Prediction of water-holding capacity and composition of porcine meat with comparative spectroscopy. *Meat Science*, 55, 177–185.
- Cernadas, E., Carrion, P., Rodriguez, P. G., Muriel, E., & Antequera, T. (2005). Analyzing magnetic resonance images of Iberian pork loin to predict its sensorial characteristics. *Computer Vision and Image Understanding*, 98, 344–360.
- Chen, H. H., Xu, S. Y., & Wang, Z. (2007). Interaction between flaxseed gum and meat protein. *Journal of Food Engineering*, 80, 1051–1059.
- Cofrades, S., Guerra, M. A., Carballo, J., Fernandez-Martin, F., & Jimenez-Colmenero, F. (2000). Plasma protein and soy fiber content effect on bologna sausage properties as influenced by fat level. *Journal of Food Science*, 65, 281–287.
- Dávila, E., Parés, D., Cuvelier, G., & Relkin, P. (2007). Heat-induced gelation of porcine blood plasma proteins as affected by pH. *Meat Science*, 76, 216–225.
- DeFreitas, Z., Sebranek, J. G., Olson, D. G., & Carr, J. M. (1977). Carrageenan effects on salt-soluble meat proteins in model systems. *Journal of Food Science*, 62, 539–543.
- Flores, N. C., Boyle, E. A. E., & Kastner, C. L. (2007). Instrumental and consumer evaluation of pork restructured with activa (TM) or with fibrinex (TM) formulated with and without phosphate. *LWT – Food Science and Technology*, 40, 179–185.
- Gordon, A., & Barbut, S. (1992). Mechanisms of meat batter stabilization: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32, 299–332.
- Gowland, P. A., & Stevenson, V. L. (2003). T<sub>1</sub>: The longitudinal relaxation time. In P. Tofts (Ed.), *Quantitative MRI of the brain. Measuring changes caused by disease* (pp. 111–143). West Sussex, England: John Wiley & Sons.
- Guiheneuf, T. M., Parker, A. D., Tessier, J. J., & Hall, L. D. (1997). Authentication of the effect of freezing/thawing of pork by quantitative magnetic resonance imaging. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 35, S112–S118.
- Guiheneuf, T. M., Tessier, J. J., Herrod, N. J., & Hall, L. D. (1996). Magnetic resonance imaging of meat products: Automated quantitation of the NMR relaxation parameters of cured pork, by both bulk NMR and MRI methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 71, 163–173.
- Guzmán, J. C., Mcmillin, K. W., Bidner, T. D., Dugas-Sims, S., & Godber, J. S. (1995). Texture, color and sensory characteristics of ground beef patties containing bovine blood proteins. *Journal of Food Science*, 60, 657–660.
- Hanson, S. W. F., & Olley, J. (1963). Application of the Bligh and Dyer method of lipid extraction to tissue homogenates. *Biochemical Journal*, 89, 101P–102P.
- Hermansson, A. M. (1982). Gel characteristics – Structure as related to texture and water binding of blood – plasma gels. *Journal of Food Science*, 47, 1965–1972.
- Herrero, A. M., Cambero, M. I., Ordóñez, J. A., Castejón, D., Romero de Ávila, M. D., & de la Hoz, L. (2007). Magnetic Resonance Imaging, rheological properties and physico-chemical characteristics of meat systems with fibrinogen and thrombin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9357–9364.
- Herrero, A. M., Cambero, M. I., Ordóñez, J. A., de la Hoz, L., & Carmona, P. (2009). Plasma powder as cold-set binding agent for meat system: Rheological and Raman spectroscopy study. *Food Chemistry*, 113, 493–499.
- Hong, G. P., Ko, S. H., Choi, M. J., & Min, S. G. (2008). Effect of glucono-δ-lactone and κ-carrageenan combined with high pressure treatment on the physico-chemical properties of restructured pork. *Meat Science*, 79, 236–243.
- Hongsprabhas, P., & Barbut, S. (1999). Use of cold-set whey protein gelation to improve poultry meat batters. *Poultry Science*, 78, 1074–1078.
- Ionescu, A., Aprodu, I., Daraba, A., & Porneala, L. (2008). The effects of transglutaminase on the functional properties of the myofibrillar protein concentrate obtained from beef heart. *Meat Science*, 79, 278–284.
- Jarmoluk, A., & Pietrasik, Z. (2003). Response surface methodology study on the effects of blood plasma, microbial transglutaminase and κ-carrageenan on pork batter gel properties. *Journal of Food Engineering*, 60, 327–334.
- Kauffman, R. G., Eikelenboom, G., van der Wal, P. G., Merkus, G., & Zaar, M. (1986). The use of filter paper to estimate drip loss of porcine musculature. *Meat Science*, 18, 191–198.
- Kemi, V. E., Karkkainen, M. U., & Lamberg-Allardt, C. J. E. (2006). High phosphorus intakes acutely and negatively affect Ca and bone metabolism in a dose-dependent manner in healthy young females. *British Journal of Nutrition*, 96, 545–552.
- Laurent, W., Bonny, J. M., & Renou, J. P. (2000). Muscle characterisation by NMR imaging and spectroscopic techniques. *Food Chemistry*, 69, 419–426.
- Law, N., Frost, C., & Wald, N. (1991). By how much does dietary salt reduction lower blood pressure. I – Analysis of observational data among populations. *British Medical Journal*, 302, 811–815.
- Means, W. J., Clarke, A. D., Sofos, J. N., & Schmidt, G. R. (1987). Binding, sensory and storage properties of algin/calcium structured beef steaks. *Journal of the Food Science*, 52, 252–256.
- Mitchell, A. D., Scholz, A. M., Wang, P. C., & Song, H. (2001). Body composition analysis of the pig by magnetic resonance imaging. *Journal of Animal Science*, 79, 1800–1813.
- Monahan, F. J., & Troy, D. J. (1997). Overcoming sensory problems in low fat and low salts products. In A. M. Pearson & T. R. Dutson (Eds.), *Production and processing of healthy meat, poultry and fish products. Advances in meat research series* (Vol. 11, pp. 257–281). London: Chapman & Hall.
- Motoki, M., & Seguro, K. (1998). Transglutaminase and its use for food processing. *Trends in Food Science and Technology*, 9, 204–210.
- Papi, M., Arcovito, G., De Spirito, M., Amiconi, G., Bellelli, A., & Boumis, G. (2005). Simultaneous static and dynamic light scattering approach to the characterization of the different fibrin gel structures occurring by changing chloride concentration. *Applied Physics Letters*, 86, 183901–183903.
- Parés, D., Saguier, E., Saurina, J., Suñol, J. J., & Carretero, C. (1998). Functional properties of heat induced gels from liquid and spray-dried porcine blood plasma as influenced by pH. *Journal of Food Science*, 63, 958–961.
- Regenstein, J. M. (1984). Protein–water interactions in muscle foods. *Reciprocal Meat Conference Proceedings*, 37, 44–51.
- Renou, J. P., Foucat, L., & Bonny, J. M. (2003). Magnetic resonance imaging studies of water interactions in meat. *Food Chemistry*, 82, 35–39.
- Roodink, H. B. J., & Zuidweg, P. (2003). Preparation of blood plasma powder for bonding together pieces of foodstuff, e.g. meat, involves preparing fibrinogen concentrate from blood plasma, and spray-drying fibrinogen concentrate to form powder. Patent Number(s): WO2003063607-A; WO2003063607-A1; NL1019873-C2; AU2003203315-A1; EP1469740-A1; US2005170068-A1.
- Ruiz-Cabrera, M. A., Gou, P., Foucat, L., Renou, J. P., & Daudin, J. D. (2004). Water transfer analysis in pork meat supported by NMR imaging. *Meat Science*, 67, 169–178.
- Ruiz-Carrascal, J., & Regenstein, J. (2002). Emulsion stability and water uptake ability of chicken breast muscle proteins as affected by microbial transglutaminase. *Journal of Food Science*, 67, 734–739.
- Santos, C., Ordoñez, J. A., Cambero, M. I., D'Arrigo, M., & Hoz, L. (2004). Physicochemical characteristics of an α-linolenic acid and α-tocopherol enriched cooked ham. *Food Chemistry*, 88, 123–128.
- Seideman, S. C., Smith, G. C., Carpenter, Z. L., & Dill, C. W. (1979). Plasma protein isolate and textured soy protein in ground beef formulation. *Journal of Food Science*, 44, 1032–1035.
- Shaarani, S. M., Nott, K. P., & Hall, L. D. (2006). Combination of NMR and MRI quantitation of structure and structure changes for convection cooking of fresh chicken meat. *Meat Science*, 72, 398–403.
- Simpson, N. E., Grant, S. C., Blackburn, S. J., & Constantinidis, I. (2003). NMR properties of alginate microbeads. *Biomaterials*, 24, 4941–4948.
- Standeven, K. F., Ariens, R. A. S., & Grant, P. J. (2005). The molecular physiology and pathology of fibrin structure/function. *Blood Reviews*, 19, 275–288.
- Suter, D. A., Sustek, E., Dill, C. W., Marshall, W. H., & Carpenter, Z. L. (1976). A method for measurement of the effect of blood protein concentrates on the binding forces in cooked ground beef patties. *Journal of Food Science*, 41, 1428–1432.
- Tingle, J. M., Pope, J. M., Baumgartner, P. A., & Sarafis, V. (1995). Magnetic resonance imaging of fat and muscle distribution in meat. *International Journal of Food Science and Technology*, 30, 437–446.
- Trout, G. R. (1989). The effect of carbonate and sodium alginate on the colour and bind strength of restructured beef steaks. *Meat Science*, 25, 163–175.
- Van Ginkel, S., Sung, S., & Lay, J. J. (2001). Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environmental Science and Technology*, 35, 4726–4730.
- Vindigni, A., & Di Cera, E. (1996). Release of fibrinopeptides by the slow and fast forms of thrombin. *Biochemistry*, 35, 4417–4426.
- Wheeler-Kingshott, A. M., Barker, G. J., Steens, S. C. A., & van Buchem, M. (2003). ADC: The diffusion of water. In P. Tofts (Ed.), *Quantitative MRI of the brain. Measuring changes caused by disease* (pp. 203–210). West Sussex, England: John Wiley & Sons.
- Whiting, R. C. (1987). Influence of various salts and water soluble compounds on water and fat exudation and gel strength of meat batters. *Journal of Food Science*, 52, 1130–1132.
- Whiting, R. C. (1988). Solute-protein interactions in a meat batter. *Reciprocal Meat Conference Proceeding*, 41, 53–56.



### ***CAPÍTULO 3.***

**ESTUDIO DE LA VIABILIDAD DEL SISTEMA  
TRANSGLUTAMINASA DE ORIGEN MICROBIANO Y DE  
AGENTES DERIVADOS DEL PLASMA SANGUÍNEO PARA  
LA REESTRUCTURACIÓN DE PERNILES DESHUESADOS  
DESTINADOS A LA ELABORACIÓN DE JAMÓN CURADO**



## **Planteamiento del trabajo y objetivos**

*Los resultados obtenidos en las primeras etapas permitieron afrontar el objetivo principal de la investigación “evaluar la eficacia de distintos agentes de ligazón en frío para la reestructuración de perniles deshuesados en fresco destinados a la elaboración de jamón curado”.*

*En esta etapa se utilizó transglutaminasa de origen microbiano (MTGasa), dado que es uno de los sistemas de ligazón en frío más utilizados en la industria cárnica y agentes de plasma sanguíneo (sistema fibrinógeno-trombina y preparado de plasma sanguíneo deshidratado). Estos últimos tienen la ventaja de ser de origen animal y en concreto pueden ser de porcino, no ajenos a la naturaleza del producto a tratar.*

*El sistema fibrinógeno-trombina se comercializa congelado, y es necesaria su descongelación o atemperado y homogenización para su empleo. El preparado de plasma sanguíneo, al igual que la MTGasa, es deshidratado y se puede aplicar en polvo o rehidratado.*

*Los objetivos parciales afrontados en este capítulo fueron:*

- 1. Estudio del efecto de diversos factores de proceso en los parámetros de ligazón (fuerza y velocidad de ligazón) en sistemas cárnicos modelo y en perniles reestructurados sometidos a curación.*
- 2. Analizar la microestructura de las áreas de unión entre superficies cárnicas en productos reestructurados.*

*La investigación se planteó con una primera etapa de trabajo a desarrollar en sistemas cárnicos modelo, donde se ensayaron los agentes de ligazón en frío en distintas condiciones de elaboración. Las razones de la propuesta fueron estudiar el efecto de diversos factores (como el tratamiento previo de la carne, modo de preparación del agente de ligazón en frío, procedimiento de envasado y temperatura) para adecuar las condiciones de procesado más convenientes para conseguir una cohesión firme entre superficies musculares.*

*En una segunda etapa se determinó la viabilidad de los agentes de ligazón en las condiciones de procesado seleccionadas en las primeras experiencias, para conseguir “cerrar” y “unir” las oquedades e incisiones en los perniles deshuesados en fresco. Estas piezas reestructuradas y cohesionadas se sometieron a un proceso de salado y secado próximo al de un proceso convencional de elaboración de jamón curado.*



**CAPÍTULO 3. ESTUDIO DE LA VIABILIDAD DEL SISTEMA TRANSGLUTAMINASA DE ORIGEN MICROBIANO Y DE AGENTES DERIVADOS DEL PLASMA SANGUÍNEO PARA LA REESTRUCTURACIÓN DE PERNILES DESHUESADOS DESTINADOS A LA ELABORACIÓN DE JAMÓN CURADO**

Los resultados de este capítulo se recogen en los siguientes artículos:

- **ARTÍCULO 3.1.** Microbial transglutaminase for cold-set binding of unsalted/salted pork models and restructured dry ham
- **ARTÍCULO 3.2.** A study on the suitability of plasma powder for cold-set binding of pork and restructured dry ham
- **ARTÍCULO 3.3.** Dry-cured ham restructured with fibrin





**ARTÍCULO 3.1.**

**Microbial transglutaminase for cold-set binding of  
unsalted/salted pork models and restructured dry ham**

**Meat Science. (2010). 84 (4), 747 – 754.**





## Microbial transglutaminase for cold-set binding of unsalted/salted pork models and restructured dry ham

M.D. Romero de Ávila<sup>a</sup>, J.A. Ordóñez<sup>a</sup>, L. de la Hoz<sup>a</sup>, A.M. Herrero<sup>b</sup>, M.I. Cambero<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Instituto del Frío (CSIC), C/José Antonio Novais, 10, 28040 Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 27 February 2009

Received in revised form 29 October 2009

Accepted 16 November 2009

#### Keywords:

Microbial transglutaminase

Cold-set binder

Binding parameters

Microstructure

Restructured dry ham

### ABSTRACT

The viability of using microbial transglutaminase (MTGase) as a cold-set binder for restructuring and manufacturing deboned dry ham (RDH) was evaluated. The influence of meat pre-treatment, preparation of the MTGase, packing system and set temperature on the binding rate and force was tested using pork models and deboned legs. The best binding parameters were obtained when meat surfaces were evenly distributed with salts (NaCl, KNO<sub>3</sub>, NaNO<sub>2</sub>) and then washed with a saline solution (W), afterwards powder (P) or liquid (L) MTGase was applied, and simultaneous salting and vacuum packing (S) set at 7 °C were performed. The RDH manufactured following these procedures (WPS and WLS) was stable during drying and could resist the handling and production process. Binding force increased ( $p < 0.05$ ) during 8 weeks of drying. Scanning electron microscopy analysis showed an increase of cross-links during the drying period of RDH related to the increase in binding force.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The meat industry is effectively using different systems of cold-set bindings (alginates, fibrinogen and thrombin, transglutaminase of different origins, etc.) to manufacture restructured products from small meat pieces and to improve the stability, texture and consistency of meat and fish gels (Cambero, López, de la Hoz, & Ordoñez, 1991; Mandigo, 1988; Vigneron, 1988). There have been numerous studies (Kuraishi et al., 1997; Paardekooper & Wijngaards, 1988; Wijngaards & Paardekooper, 1988) with satisfactory results confirming that these systems develop enough bonds to eliminate the cavities produced in the meat pieces during the deboning process. Dry-cured ham manufacture is performed using either portions or whole pork legs. During the manufacture of dry-cured hams in Spain, portions of the coxis bone are retained while in France or Italy technology usually implies the almost total elimination of this bone. Sometimes, a small coxis portion (anchetta) is not removed to avoid cavity formations and thus facilitate the drying process. A clear expansion of the market (about 73% for exports) of deboned dry-cured ham is being observed (Elizalde, 2008). To satisfy these demands of the consumers, usually the meat industry produces bone-less dry-cured hams after the salting and drying process. Traditionally manufactured hams and deboned dry-cured hams may be commercialised whole or as portions or slices. Deboned hams are the most suitable ones for cutting or slicing. This fact highlights

a motivation to develop an adequate procedure for dry-cured ham manufacture using deboned fresh legs as raw material. The production of dry-cured ham essentially consists of salt diffusion into the meat and progressive dehydration. The aim of the process is to stabilize the ham by decreasing the water activity ( $a_w$ ) and, at the same time, the development of the appropriate biochemical reactions that produce the typical sensory characteristics. This process may affect the action of the cold-set binders, in this case microbial transglutaminase (MTGase) systems. The transglutaminase (TG) enzyme catalyzes cross-linking between protein molecules (Yokoyama, Nio, & Kikuchi, 2004) by an acyl transfer reaction between the  $\gamma$ -carboxamide group of a peptide-bound glutaminy residue (acyl donor) and a variety of primary amines (acyl receptors), including the amino group of lysine. The TG currently utilized has a microbiological origin (MTGase), which has been tested in the manufacture of several meat and fish products: i.e. frankfurters (Jimenez-Colmenero, Ayo, & Carballo, 2005), beef protein gels (Dondero, Figueroa, Morales, & Curotto, 2006) and restructured pork products (Flores, Boyle, & Kastner, 2007). No study has been found related to the use of TG on dry-cured ham processing. Several authors (Costa, Bergamin, Silveira, & Felício, 2008) added MTGase in an aqueous solution to muscle groups separated after completion of salting to obtain bone-less restructured dry-cured hams. These authors reported that MTGase affected the protein functional properties, specially the binding capacity, thus the use of MTGase in dry-cured hams may be responsible for enhancing their springiness and cohesiveness. The acceptability of deboned dry-cured ham involves many factors, such as easy slicing and control of “deep spoilage” (*cala* in Spanish). In the dry-cured ham

\* Corresponding author. Tel.: +34 913943745; fax: +34 913943743.

E-mail address: [icambero@vet.ucm.es](mailto:icambero@vet.ucm.es) (M.I. Cambero).

industry the “*cala*” describes a group of changes, characterised by off-odours, which make the product unacceptable for consumption, with corresponding economic losses implied. In Spanish processes, about 1–2% of manufactured hams undergo deep spoilage and have to be discarded (Paarup, Nieto, Peláez, & Reguera, 1999).

All these facts lead to the possibility of using cold-set binders to form meat pieces that can be manufactured, using modified procedures, into what is expected of Spanish dry-cured ham.

The main objective of this work has been the evaluation of the microbial transglutaminase (MTGase) for fresh deboned pork leg restructuration before or after a salting and drying process in order to ultimately produce deboned dry-cured ham. For this purpose, the effect of factors such as meat treatment, preparation of MTGase, packing procedure and binding temperature on the binding parameters of pork model complexes and restructured dry ham manufactured following a process resembling the traditional one were evaluated. Also, the microstructure of the resulting binding surfaces was analyzed by scanning electron microscopy.

## 2. Material and methods

### 2.1. Experiments with pork model complex

#### 2.1.1. Experimental design

The variables (meat treatment, preparation of the microbial transglutaminase, packing and binding temperature) used to obtain the pork model complex are described in Table 1.

The pork model complexes were manufactured at three different times (February, May and October). In the three cases, each individual pork model complex was manufactured in triplicate; a different pork piece being used in each case.

#### 2.1.2. Meat preparation and treatment

Pork cubes ( $10 \times 10 \times 10$  cm) were obtained from fresh pork (*M. biceps femoris*) purchased at 48 h *post mortem* from a local abattoir. The visible fat and connective tissue were removed from the meat cubes. Afterwards, as indicated in Table 1, the pork cubes received one of the following procedures (U, I and W): (U) without additional treatment; (I) immersion in a saline (NaCl with about 200 ppm of  $\text{KNO}_3$  and 100 ppm of  $\text{NaNO}_2$ ) aqueous solution (3%, w/v) for 10 min at 4 °C after which the excess liquid was removed using a filter paper; and (W) even distribution of a mixture of salts (NaCl with about 200 ppm of  $\text{KNO}_3$ , and 100 ppm of  $\text{NaNO}_2$ ) on the surfaces for 1 min and, after 10 min of setting time, the pork cubes were washed with an aqueous solution of the same salt mixture

(NaCl with about 200 ppm of  $\text{KNO}_3$ , and 100 ppm of  $\text{NaNO}_2$ ) after which the excess liquid was removed using a filter paper.

#### 2.1.3. Preparation of microbial transglutaminase (MTGase)

Microbial transglutaminase (ACTIVA EB, binding effect, Ajinomoto Co., Inc., Tokyo, Japan) was obtained as a free sample from Impex Química S.A. (distributor in Spain). ACTIVA EB, used in a freeze-dried form, was composed of sodium caseinate (60%), maltodextrin (39.5%) and microbial transglutaminase (MTGase) (0.5%), as an enzyme with the ability to cross-link proteins, with an activity of 50 units  $\text{g}^{-1}$ .

Two different procedures for applying MTGase (Table 1) on binding meat surface were used (P, L): (P) powder, and (L) liquid, composed by a solution of MTGase at 0.1% in aqueous solution of NaCl 3% (w/v), with a transglutaminase activity of approximately 10 units  $\text{g}^{-1}$ .

The powder (P) or liquid (L) MTGase was carefully spread trying to cover one of the pork cube surfaces.

#### 2.1.4. Preparation of the pork model complex (M/MT/M)

One pork cube (U, I or W) surface covered with the MTGase (P or L) was put into contact with a similarly processed pork cube (U, I or W) surface and the complex (meat/MTGase/meat, M/MT/M) was packed.

#### 2.1.5. Packing

The pork model complexes (M/MT/M) were packed (Table 1) using three different procedures (A, V and S): (A) in plastic containers at atmospheric pressure; (V) vacuum-packed (20 kPa) in plastic bags, and (S) vacuum-packed (20 kPa) in plastic bags with M/MT/M covered with a dry mixture of salts (simultaneous binding and salting procedure). The mixture of salts (NaCl with 200 ppm of  $\text{KNO}_3$ , and 100 ppm of  $\text{NaNO}_2$ ) was similar to that used for dry-cured ham manufacturing and the amount used was equivalent to 2% of the weight of the pork model complex (Santos, Hoz, Cambero, Cabeza, & Ordóñez, 2008).

#### 2.1.6. Binding temperature

Pork model complexes were set at three (Table 1) different temperatures (0, 7 and 24 °C) during the first 24 h (binding period).

After the different binding periods, the pork model complexes (M/MT/M) were removed from the plastic containers and those corresponding to the procedure S (Table 1) were brushed to eliminate the excess of salt. Afterwards, the analyses were performed.

**Table 1**  
Variables used for the preparation of meat model complex and restructured dry ham.

Meat treatment	Symbol
Untreated	U
Immersed in aqueous solution of a mixture of salts (NaCl with 200 ppm of $\text{KNO}_3$ , and 100 ppm of $\text{NaNO}_2$ ) at 3% (w/v) for 10 min	I
Even distribution of (1 min) a mixture of salts (NaCl with 200 ppm of $\text{KNO}_3$ , and 100 ppm of $\text{NaNO}_2$ ) on the surfaces, setting time 10 min, and washed with aqueous solution of the mixture of salts at 3% (w/v)	W
<i>Preparation of the microbial transglutaminase (MTGase)</i>	
Powder	P
Liquid, solution of MTGase at 0.1% (w/v) in aqueous solution of NaCl 3% (w/v) with a transglutaminase activity of approximately 10 units $\text{g}^{-1}$	L
<i>Packing</i>	
Atmospheric pressure in plastic containers	A
Vacuum packing at 20 kPa in plastic bags	V
Vacuum packing at 20 kPa in plastic bags with meat product covered with the mixture of salts (simultaneous binding and salting procedure)	S
<i>Binding temperature</i>	
0 °C	0
7 °C	7
24 °C	24

## 2.2. Experiments with fresh deboned leg

### 2.2.1. Experimental design

The selected variables (meat treatment, preparation of the microbial transglutaminase, packing and binding temperature) used to prepare the pork model complex were also considered for the restructuring of the deboned pork leg (Table 1).

For each restructured dry ham manufacturing process 15 deboned legs were used.

### 2.2.2. Fresh deboned leg preparation and treatment

Fresh deboned pork legs weighing about 6 kg were purchased at 48 h *post mortem* in a local meat processor.

The uncovered muscular surfaces resulting from the deboning process were treated with procedures I or W (Table 1).

### 2.2.3. Preparation of microbial transglutaminase (MTGase)

To restructure the fresh deboned legs, powder and liquid MTGase were used (Table 1). MTGase (P or L) was gently applied onto those uncovered muscular surfaces resulting from the deboning process.

### 2.2.4. Packing and salting of fresh deboned leg treated with MTGase

The fresh deboned legs treated with MTGase were packed (Table 1) using the procedure S (simultaneous binding and salting procedure). The mixture of salts (NaCl with 200 ppm of KNO<sub>3</sub>, and 100 ppm of NaNO<sub>2</sub>) was used in an amount equivalent to 2% of the weight of meat (Santos et al., 2008). The mixture of salts and a fresh deboned leg, in which the muscular surfaces resulting by the deboning process were covered with MTGase, was vacuum-packed (20 kPa) and set into plastic bags at 7 °C for a period of 1 day per kg of meat.

### 2.2.5. Drying of fresh deboned leg treated with MTGase

At the end of the salting period (about 6 days) and after removing the fresh deboned leg treated with MTGase from the plastic bags, the surfaces were cleaned of excess salt and dried for up to 15 weeks at 10 °C and 80% relative humidity. The final salted and dried product was named restructured dry ham (RDH).

## 2.3. General determinations

### 2.3.1. Dry matter, ash content, fat content, pH, water activity and water-holding capacity

The dry matter (oven air-drying method) and ash (muffle furnace) were analyzed following AOAC (1995) procedures. The salt content of the M/MT/M complexes and RDH was estimated by subtracting the ash content of fresh meat from the content of salted samples. The fat content, used to calculate the defatted dry matter, was estimated by the method of Bligh and Dyer as described by Santos et al. (2008). The pH and water activity ( $a_w$ ) were determined using a Crison Digit-501 pH meter (Crison Instruments Ltd., Barcelona, Spain) and a Decagon CX1 hygrometer (Decagon Devices Inc., Pullman, WA) at 25 °C, respectively. Water-holding capacity (WHC) was measured by using the Carver Press Method (Kauffman, Eikelenboom, van der Wal, Merkus, & Zaar, 1986). This method used a 0.3 g sample pressed onto an oven-dried Whatman 125 mm filter paper. The WHC values were calculated as the percentage of water retained when compared to the water content in the product before pressing. Four replicates of each sample were determined.

### 2.4. Binding force measurement

The binding force (BF) or strength required (N cm<sup>-2</sup>) to separate the meat portions bound by the cross-links (in both M/MT/M and

RDH) originated by the microbial transglutaminase action was determined using a TA.XT2i SMS Stable Micro Systems Texture Analyser (Stable Microsystems Ltd., Surrey, England) with the *Texture Expert* programmes.

Five rectangular slices from every pork model complex (M/MT/M) were obtained using an electric rotary food processor. Slices were approximately 7 cm long, 2.5 cm wide and 0.5 cm thick. We attempted to maintain the microbial transglutaminase union at the transverse central line of the meat rectangle. A load cell of 5 kg was employed. For analysis, the samples were placed between one tensile grip (A/TGT) fixed onto the base of the textural analyser, while the other one was attached to the load cell. Initial grip separation was 12.5 mm and crosshead speed was 1.0 mm/s until rupture (Herrero et al., 2007). Rupture force was taken as the maximum force peak height (N) required for breaking the sample. Binding force (N cm<sup>-2</sup>) was obtained by dividing the rupture force by the cross-sectional area (thickness × width) of the portions. The binding force analyses of the M/MT/M were performed at intervals of 30 min during a period of 6 h and every hour afterwards.

To determine the binding force of the restructured dry ham (RDH), it was cut into a cube in which the MTGase suture was located approximately in the central line. From this cube, 10 rectangular slices were obtained using an electric rotary food processor. Slices were approximately 7 cm long, 2.5 cm wide and 0.5 cm thick and there was always an attempt to maintain the microbial transglutaminase union on the transversal central line of the meat rectangle. The materials and conditions of analysis used were similar to those previously described for determining the binding force of the pork model complex. The binding force analyses of the RDH were performed every seven days during the drying time period (15 weeks).

### 2.5. Scanning electron microscopy analysis (SEM)

The SEM on the restructured dry hams (RDH) during the drying time was performed in the “Centro de Microscopía y Citometría de la Universidad Complutense de Madrid”. Samples were cut into cubes (0.5 × 0.5 × 0.5 cm) and fixed in 3% glutaraldehyde buffered physiological solution for 4 h at 4 °C. Then, samples were dehydrated by gradually increasing ethanol solutions from 30% to 100%, after which they were dried in liquid critical-point carbon dioxide, and then coated with graphite and gold for analysis in a scanning electron microscope (JEOL, mod. JSM-6400). Samples were magnified from ×30 up to ×5000 times.

### 2.6. Statistical analysis

The experimental units corresponded to the individual meat model complex (M/MT/M) and restructured dry ham (RDH). Data are presented as the means and standard deviations (SD) of each model (M/MT/M or RDH). Differences among means were established by ANOVA and Duncan's multiple comparison procedure using Statgraphic Plus 5.5. Simple regression analyses (using a Durbin–Watson statistic tests, at 95% of confidence level) were performed to determine the relationships between data obtained by binding force determination and physico-chemical analysis. In the case of M/MT/M, a non linear regression was performed in order to fit the binding force as a function of binding time (SPSS 15.0 for Windows). The logistic model permitted the maximum binding force ( $F_{max}$ ) to be obtained. The binding rate ( $k$ ) was calculated according to Richards function (Causton & Venus, 1981; Richard, 1959); it assumes that binding force ( $F$ ) increases linearly with time ( $t$ ) from an initial value ( $F_{ini}$ ) to a maximum value ( $F_{max}$ ).

$$\frac{dF}{dt} = k \left( 1 - \frac{\ln F_{ini}}{\ln F_{max}} \right)$$

The effect of the factors or variables (2 meat treatment  $\times$  2 preparation of transglutaminase  $\times$  3 packing  $\times$  3 binding temperature as indicated in Table 1), and their interactions were analyzed by a multifactor ANOVA, using Statgraphic Plus 5.5.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Physico-chemical composition

In the course of restructured dry ham (RDH) processing, the water content and water activity ( $a_w$ ) showed a significant ( $p < 0.05$ ) decrease during the first 2 weeks of process, with values in fresh meat of  $75.29 \pm 1.14\%$  and  $0.970 \pm 0.003$ , respectively;  $69.09 \pm 4.39\%$  and  $0.926 \pm 0.044$  after salting;  $51.57 \pm 3.21\%$  and  $0.884 \pm 0.014$  at 2 weeks of drying. After that values were maintained reaching  $49.80 \pm 4.30\%$  and  $0.865 \pm 0.023$  at 9–15 weeks of drying. The ash content (% product) and the water-holding capacity (WHC,%) showed a significant ( $p < 0.05$ ) increase with values of  $1.11 \pm 0.12\%$  and  $49.9 \pm 4.7$ , respectively in fresh meat,  $4.9 \pm 1.9\%$  and  $53.3 \pm 7.7$  after salting,  $9.3 \pm 3.1\%$  and  $66.9 \pm 4.6$  at 2 weeks of drying,  $9.8 \pm 2.4\%$  and  $70.8 \pm 6.1$  at 4 weeks of drying. At 9–15 weeks of drying the values were  $9.8 \pm 3.2\%$  and  $75.9 \pm 3.7$ , respectively. The meat used to manufacture the M/MT/M complexes and RDH had similar pH values, around  $5.6 \pm 0.3$ . The pH values of RDH after salting were about  $5.64 \pm 0.10$ . During the drying period (1st to 15th week), the pH values were about  $5.8 \pm 0.06$ . These pH values are included in the range mentioned to be optimum (5–8) for MTGase activity. However, this enzyme also shows activity at pH 4 and 9 (Ando et al., 1989).

#### 3.2. Experiments with pork model complex made with MTGase (M/MT/M)

A preliminary experiment was conducted to establish how several factors contributed to the binding rate and force of pork model complex made with MTGase (M/MT/M). The variables used for the preparation of M/MT/M are shown in Table 1.

##### 3.2.1. Binding force of M/MT/M as affected by meat treatment, preparation of transglutaminase, packing and binding temperature

Multifactor ANOVA results (Table 2) for binding parameters indicated that both binding rate ( $\text{N cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ) and maximum binding force ( $\text{N cm}^{-2}$ ) were significantly affected ( $p < 0.05$ ) by meat treatment, preparation of MTGase, packing procedure and binding temperature when MTGase was used as a cold-set binding agent. Preparation of the MTGase and packing showed the maximum effect ( $p < 0.005$  or  $p < 0.001$ ) in both binding parameters. This was followed by meat treatment and binding temperature ( $p < 0.01$ ). Many interactions (Table 2) were found among the studied factors. For both binding parameters no interactions ( $p > 0.05$ ) between meat treatment and binding temperature factors were observed. These results indicated that the meat treatment effect on the cross-links originated by the MTGase between fresh meat surfaces is independent of the binding temperature. However, the contribution to binding parameters due to one of the remaining factors (meat treatment, preparation of MTGase and packing) is affected by the influence of one or more of the other factors (significant interactions,  $p < 0.05$ ). When the data of the binding parameters (binding rate,  $k$  and maximum binding force,  $F_{\max}$ ) were grouped according to a specific factor (those variables indicated in Table 1), significant effects were observed in the meat treatment (I vs U) for  $k$  ( $p < 0.02$ ) and  $F_{\max}$  ( $p < 0.05$ ) with values of group I  $>$  U; significant effects of preparation of MTGase (L vs P) with P  $>$  L values ( $p < 0.001$  for  $k$  and  $F_{\max}$ ); significant effects of packing system (A vs V) with V  $>$  A values ( $p < 0.005$  for  $k$  and  $F_{\max}$ ), and significant

**Table 2**

$p$ -Value of the effects (meat treatment, preparation of transglutaminase, packing and binding temperature) and their interactions on binding rate ( $\text{N cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ) and maximum binding force ( $\text{N cm}^{-2}$ ) of meat model complex bound using microbial transglutaminase (MTGase) as cold-set binding agent.

Factors <sup>a</sup>	Binding rate <sup>b</sup> $p$ -Value	Maximum binding force $p$ -Value
A: Meat treatment	<0.01	<0.01
B: Preparation of MTGase	<0.005	<0.001
C: Packing	<0.001	<0.005
D: Binding temperature	<0.01	<0.01
Interactions		
A vs B	<0.05	<0.05
A vs C	<0.05	<0.01
A vs D	>0.05	>0.05
B vs C	<0.005	<0.001
B vs D	<0.05	<0.001
C vs D	<0.05	<0.05
A vs B vs C	<0.01	<0.01
A vs B vs D	>0.05	>0.05
A vs C vs D	>0.05	<0.05
B vs C vs D	<0.05	<0.05
A vs B vs C vs D	>0.05	<0.05

<sup>a</sup> As indicated in Table 1.

<sup>b</sup> Binding rate ( $k$ ) was calculated according to Richard's function assuming that binding force ( $F$ ) increased linearly in time ( $t$ ) from an initial value ( $F_{\text{ini}}$ ) to a maximum value ( $F_{\text{max}}$ ).  $\frac{dF}{dt} = k \left( 1 - \frac{\ln F_{\text{ini}}}{\ln F_{\text{max}}} \right)$ .

effects of binding temperature (0 vs 7 vs 24) with values of group  $24 = 7 > 0$  ( $p < 0.01$  for both binding parameters). Also, the simultaneous binding and salting procedure (S packing, Table 1) produced significantly higher values for  $k$  and  $F_{\max}$  ( $p < 0.001$ , for both binding parameters) than those obtained for the group V. The significant effects of the factors studied on the binding parameters are reflected in the results shown in Table 3. Because of this, when binding parameters ( $k$  and  $F_{\max}$ ) obtained for all model meat complexes (M/MT/MT) were compared, the highest ( $p < 0.05$ ) binding rate ( $\text{N cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ) and maximum binding force ( $\text{N cm}^{-2}$ ) was reached by the pork model complex IPS [elaborated with meat immersed in aqueous solution of a mixture of salts (NaCl with 200 ppm of  $\text{KNO}_3$ , and 100 ppm of  $\text{NaNO}_2$ ) at 3% (w/v) for 10 min, bound with powder MTGase and packed at vacuum after they were covered with dry salt] setting at 7 and 24 °C (Table 3). This model complex at 0 °C, and those packed at vacuum without salt (IPV) maintained at 7 and 24 °C and the UPS and UPV (manufactured with untreated meat, bound with powder MTGase and packed at vacuum with or without salt) setting at 7 and 24 °C, reached similar  $F_{\max}$  ( $p > 0.05$ ) but lower  $k$  ( $p < 0.05$ ) than IPS (Table 3). The models ULA and ILA (Table 1) maintained at 0 or 7 °C and IPA at 0 °C showed (Table 3) the lowest binding rate and maximum binding force ( $p < 0.05$ ). The effects of the binding period and temperature on the binding force in the IPS models are shown in Fig. 1. Similar effects have been observed in all the meat models complexes studied. The slowest cross-linking reaction by action of MTGase occurred at 0 °C with similar values at 7 and 24 °C (Fig. 1). At these temperatures, a setting time of about 4 h is enough to reach the maximum binding force in IPS models (Fig. 1 and Table 3). Other authors (Kuraishi et al., 1997) reported binding time of 5 h for the maximum binding strength of restructured meat (maintained at 5 °C) treated by MTGase.

The positive effect of immersing the pork in aqueous saline solution (I procedure, Table 1) prior to the MTGase application and cold-set binding, could be attributed to the salt induced solubilization of superficial myofibrillar proteins (Brondum et al., 2000; Ramírez, Uresti, Téllez, & Vázquez, 2002), which causes the generation of exudates that act like a binding agent (Ghavimi, Althen, & Rogers, 1987; Ramírez et al., 2002). Also, the exuded proteins serve as a good substrate for cross-linking reactions by MTGase (Kuraishi

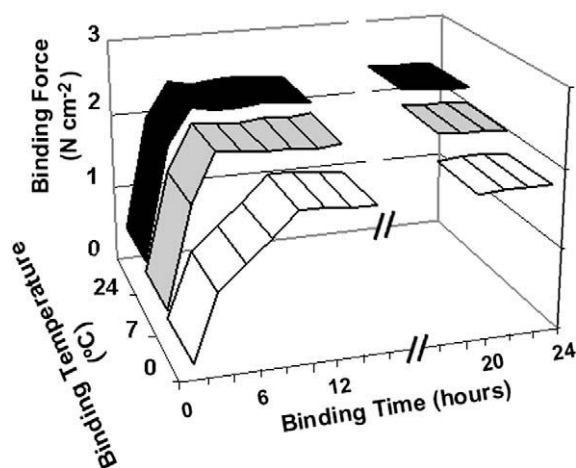


**Table 3**

Binding rate ( $k$ ) and maximum binding force ( $F_{max}$ ) reached at different temperatures by meat model complex using microbial transglutaminase (MTGase) as cold-set binding agent.

Temperature (°C)	Model complex	$k$ (N cm <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )	$F_{max}$ (N cm <sup>-2</sup> )	Model complex	$k$ (N cm <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )	$F_{max}$ (N cm <sup>-2</sup> )
0	UPA	0.06 ± 0.01c,d	0.90 ± 0.21d	ULA	0.04 ± 0.005d	0.45 ± 0.10e
7	UPA	0.07 ± 0.01c,d	1.00 ± 0.28c,d	ULA	0.05 ± 0.004d	0.58 ± 0.11e
24	UPA	0.11 ± 0.008c	1.33 ± 0.17b	ULA	0.09 ± 0.008c	0.71 ± 0.13e
0	UPV	0.09 ± 0.01c	1.03 ± 0.20c	ULV	0.07 ± 0.007c,d	0.89 ± 0.20d
7	UPV	0.13 ± 0.01b,c	1.50 ± 0.17b	ULV	0.11 ± 0.009c	1.08 ± 0.17c
24	UPV	0.17 ± 0.02b	1.69 ± 0.22a,b	ULV	0.11 ± 0.01c	1.11 ± 0.24 cc
0	IPA	0.07 ± 0.005c,d	0.80 ± 0.17d,e	ILA	0.05 ± 0.005d	0.62 ± 0.14e
7	IPA	0.07 ± 0.005c,d	1.13 ± 0.19c	ILA	0.06 ± 0.007c,d	0.71 ± 0.15e
24	IPA	0.09 ± 0.007c	1.38 ± 0.23b	ILA	0.09 ± 0.007c	0.93 ± 0.19d
0	IPV	0.10 ± 0.01c	1.25 ± 0.23b	ILV	0.09 ± 0.01c	1.07 ± 0.17c,d
7	IPV	0.23 ± 0.02b	1.90 ± 0.20a	ILV	0.10 ± 0.008c	1.19 ± 0.19b,c
24	IPV	0.25 ± 0.02b	1.97 ± 0.23a	ILV	0.12 ± 0.01c	1.24 ± 0.21b
0	UPS	0.10 ± 0.03c	1.10 ± 0.22c	ULS	0.09 ± 0.02c	0.93 ± 0.18d
7	UPS	0.33 ± 0.04b	2.00 ± 0.21a	ULS	0.16 ± 0.01b	1.12 ± 0.16c
24	UPS	0.35 ± 0.07b	1.98 ± 0.31a	ULS	0.18 ± 0.02b	1.20 ± 0.12b,c
0	IPS	0.23 ± 0.09b	1.87 ± 0.21a,b	ILS	0.16 ± 0.01b	1.19 ± 0.18b,c
7	IPS	0.55 ± 0.06a	2.20 ± 0.33a	ILS	0.18 ± 0.02b	1.26 ± 0.23b
24	IPS	0.59 ± 0.05a	2.38 ± 0.29a	ILS	0.20 ± 0.01b	1.32 ± 0.21b

Meat model complex: U: model prepared with untreated meat, I: model prepared with meat immersed in aqueous solution of a mixture of salts (NaCl with 200 ppm of KNO<sub>3</sub>, and 100 ppm of NaNO<sub>2</sub>) at 3% (w/v) for 10 min, W: model prepared with salted meat [mixture of salts (NaCl with 200 ppm of KNO<sub>3</sub>, and 100 ppm of NaNO<sub>2</sub>) was evenly distributed on the binding surface which was then washed with aqueous solution of the mixture of salts at 3% (w/v)], P: model prepared using powder MTGase, L: model prepared using liquid MTGase solution [at 0.1% (w/v) in aqueous solution of NaCl 3% (w/v) with a transglutaminase activity of approximately 10 units g<sup>-1</sup>]. A: meat model packed at atmospheric pressure, V: meat model packed at vacuum, S: meat model covered with a dry mixture of salts (NaCl with 200 ppm of KNO<sub>3</sub>, and 100 ppm of NaNO<sub>2</sub>) in a plastic bag closed at vacuum. a, b, c, d: Different letters for binding rate or maximum binding force values indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 1.** Binding force (N cm<sup>-2</sup>) as affected by binding temperature and time in the IPS meat model complex [prepared with pork immersed in aqueous solution of a mixture of salts (NaCl with 200 ppm of KNO<sub>3</sub>, and 100 ppm of NaNO<sub>2</sub>) at 3% (w/v) for 10 min using powder MTGase and covered with the same mixture of dry salts in a plastic bag closed at vacuum].

et al., 1997) thus permitting the formation of a three-dimensional protein net binding in the pork cubes. Although the liquid MTGase application may allow a homogeneous distribution of the MTGase, the results obtained indicated that the binding procedure was favoured by the application of powder MTGase probably because there was the highest concentration of the enzyme (about five fold) when the powder was directly applied. Several authors (Ionescu, Aprodu, Daraba, & Porneala, 2008; Kuraishi et al., 1997) reported a positive relation between levels of MTGase and binding strength for restructured meats. In relation to this, a study (Kuraishi et al., 1997) described how caseinate treated with MTGase formed a viscous sol, which was able to act as glue binding restructuring meat pieces together. The forming in the meat restructuring process may be done in casing bags or molds (Boles & Shand, 1998). The

packing by vacuum probably improved the MTGase binding process, because it favoured the contact of the pork surfaces by removing any trapped air and thus increasing the binding force. Thus, the formation of more  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lys cross-links was promoted. This action is increased when the salting and vacuum process are done simultaneously. These results are probably associated with the higher compression of the meat binding surface which favours the meat protein interaction and stabilizes the network.

In general, the M/MT/M set at 0 °C had the lowest ( $p < 0.05$ ) binding parameters (Table 3 and Fig. 1). No differences ( $p > 0.05$ ) were obtained between meat model complexes maintained at 7 or 24 °C. Previously, it has been mentioned that the optimum temperature for MTGase activity was 55 °C, this was also maintained at 10 °C and some activity was retained at near-freezing temperatures (Yokoyama et al., 2004). Our results could lead to the selection of 7 °C as an adequate setting temperature because the maximum binding force obtained is higher than the one reached at 0 °C and because a 24 °C setting would cause rapid microbial growth with the consequent meat spoilage.

Because of these results, in general, the use of salted meat (I), powder MTGase (P) and simultaneous salting and vacuum packing (S) set at 7 °C offered the most satisfactory binding behaviour (highest binding rate and force) of the MTGase when it was used as cold-set binding for the union of pork pieces.

### 3.3. Experiments to obtain restructured dry ham (RDH)

#### 3.3.1. Binding force as affected by processing system and drying time

To check the usefulness of the IPS procedure (Table 1) for manufacturing restructured dry ham (RDH), 15 dry hams from fresh deboned legs were manufactured following a process based on the traditional one described by Santos et al. (2008). The changes of the binding force along the drying time are shown in Fig. 2. The binding force of about one half of the RDH manufactured with the IPS procedure decreased during the drying time (Fig. 2) because of microbial proliferation with the production of gas and the for-



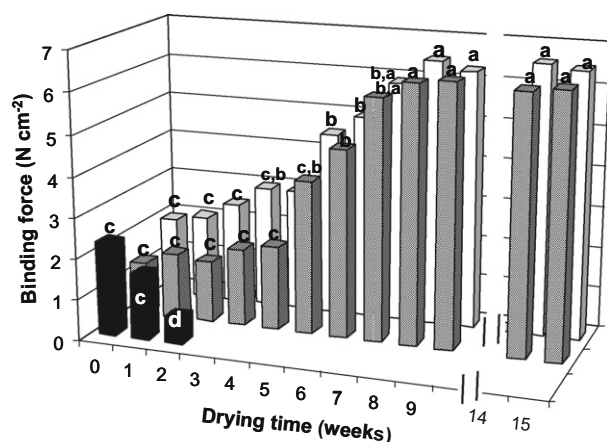


Fig. 2. Binding force ( $\text{N cm}^{-2}$ ) of restructured dry ham (IPS, WLS, WPS) as affected by drying time. IPS, WLS, WPS: as indicated in Table 1. a, b, c, d: Values of columns with different letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

mation of vacuoles resulting in ham spoilage at about 2–3 weeks into the drying time. This spoilage was localized along the binding zone. Due to these problems, it was considered necessary to enhance salt penetration on the surface of the meat and to reduce the potential for microbial growth, thus, procedures WPS and WLS (Table 1) were evaluated. In these procedures, the mixture of salts ( $\text{NaCl}$  with 200 ppm of  $\text{KNO}_3$ , and 100 ppm of  $\text{NaNO}_2$ ) was evenly distributed (1 min) on the surfaces, with a setting time of 10 min, after which they were washed with an aqueous solution of the mixture of salts at 3% (w/v). These treatments were firstly checked in meat model complex using both powder (P) and liquid (L) MTGase (WPS and WLS, Table 1), and the binding parameters were compared with previously assayed meat model complexes (IPS and ILS). The results obtained for maximum binding force at 7 °C are shown in Fig. 3. In this figure, differences are not observed ( $p > 0.05$ ) between IPS and WPS, and between ILS and WLS with values of IPS and WPS being higher ( $p < 0.05$ ) than those of ILS and WLS. The binding rates of WPS and WLS (about  $0.20 \text{ N cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ) were close to those values reached for ILS (Table 3), but lower ( $p < 0.05$ ) than those for IPS (Table 3). Dry hams were manufactured following the procedures WLS and WPS. Although when following the procedure WLS, lower maximum binding forces were reached in the meat model complex than when the

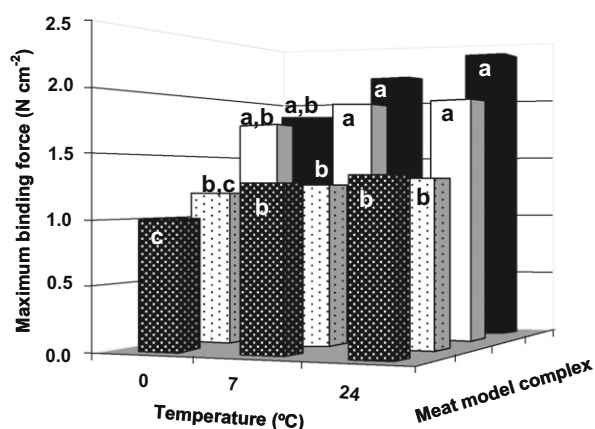


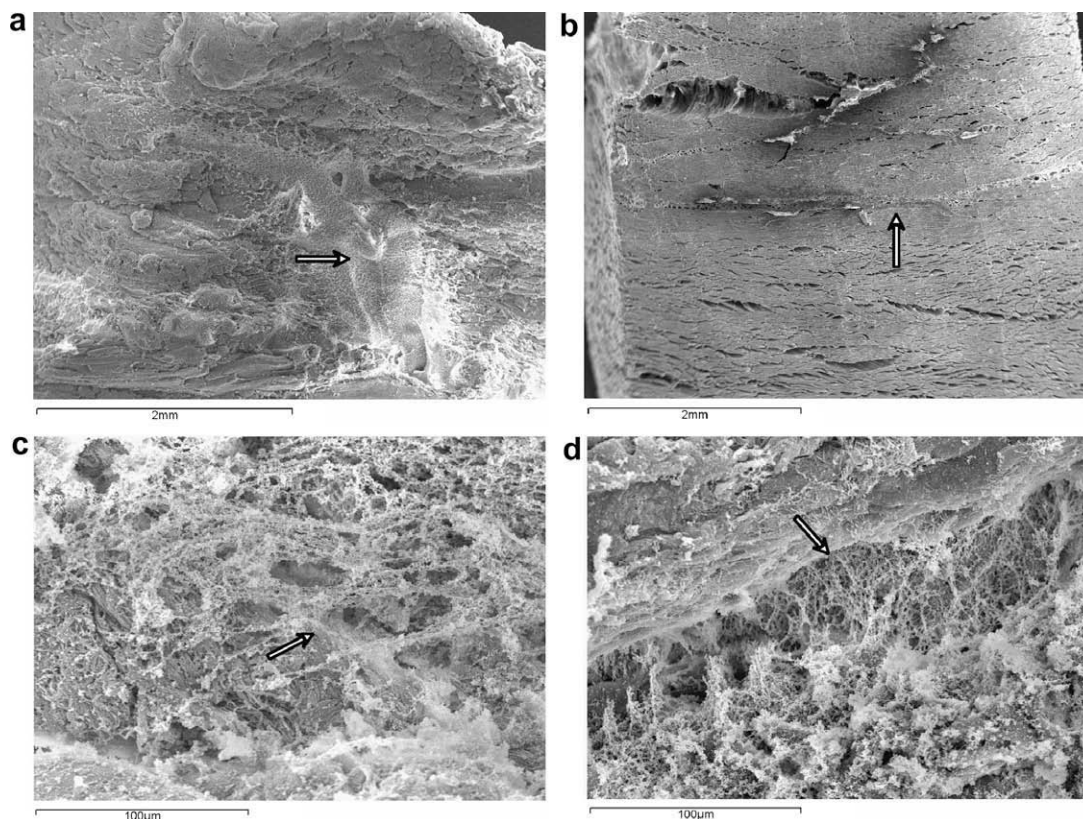
Fig. 3. Maximum binding force ( $\text{N cm}^{-2}$ ) of different meat model complex (IPS ■, WLS □, WPS ▒, ILS ▤) as affected by binding temperature. IPS, WLS, WPS, ILS: as indicated in Table 1. a, b, c: Values of columns with different letter are significant different ( $p < 0.05$ ).

system WPS was used (Fig. 3), the WLS was tested as a cold-binding system for elaborating restructured dry ham because this procedure allowed an easier and more homogeneous MTGase distribution in addition to a lower quantity of enzyme (about 20%). When applying both procedures (WPS and WLS) for restructuring deboned hams, there were no signs of spoilage during the drying process. The results for the binding force along the drying period of restructured dry ham manufactured using the procedures IPS, WPS and WLS are shown in Fig. 2. Thus, the IPS procedure was discarded because many RDH were spoiled. At a determined drying time, the procedures WPS and WLS showed similar ( $p > 0.05$ ) binding forces (BF) with values increasing ( $p < 0.05$ ) from  $1.6 \pm 0.21$  (initial dry process) to  $6.4 \pm 0.52 \text{ N cm}^{-2}$  in the 8th week of drying time (DT). In this drying period, the BF was adjusted to the expression  $[\text{BF} = (0.604 \times \text{DT}) + 1.41, p < 0.00001, R^2 = 0.97, \text{ for WPS models}]$ . After the 8th week, the binding forces were not affected ( $p > 0.05$ ) by drying time and were maintained at around  $6.5 \pm 0.78 \text{ N cm}^{-2}$ . The binding forces reached by the restructured dry hams (WLS and WPS) are similar to those shown by some dry fermented sausages (Herrero et al., 2007) and higher than those reported for cooked meat sausages (Herrero et al., 2008) which implies good resistance to handling and the manufacture process, including slicing.

The level of salt employed during massaging (WPS and WLS) the meat surface might favour the amount of exuded protein, its aggregation and the cross-linking by MTGase action (Ramírez et al., 2002). According to Kuraishi et al. (1997), 3%  $\text{NaCl}$  and 0.1% MTGase were needed to obtain a good restructured product. Moreover, our results indicated that the application of the mixture of salts ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{KNO}_3$ , and  $\text{NaNO}_2$ ) directly to the binding meat surface by hand massage could favour the fast local absorption and diffusion of the salts into the meat. The mixture of salts may limit the microbial growth associated with ham spoilage. The preserving action of nitrate and nitrite are well-known and they are usually added as potassium or sodium salts, to process meat products (Honikel, 2008). The effective substance is nitrite acting primarily as an inhibitor of some microorganisms (Honikel, 2008). Several authors (Martín et al., 2008; Paarup et al., 1999) reported that the counts of *Enterobacteriaceae* involved in spoilage of dry-cured hams were negatively affected by high  $\text{NaCl}$  concentrations. High proteolytic activity of *Enterobacteriaceae* isolated from spoiled hams has also been reported (Losantos, Sanabria, Cornejo, & Carrascosa, 2000). This activity could explain the binding force loss in restructured dry ham IPS (Fig. 2).

As expected, during dry ham processing, the water content decreased (from  $75.3 \pm 1.1$  to about  $50 \pm 4 \text{ g/100 g}$ ) while the water-holding capacity increased (ranged from  $49.9 \pm 4.7$  to  $75.9 \pm 3.8 \text{ g water/100 g product}$ ). The maximum binding force was obtained after the 7th week (Fig. 2) in which the RDH showed about 50% water level, 14.3% salt content (g  $\text{NaCl/defatted dry matter}$ ) and 0.870 water activity. The salt content values were close to the maximum amounts allowed for the specifications of Serrano dry-cured ham (European Commission, 1999), a Traditional Speciality Guaranteed from Spain [Article 13(2) of Regulation (EEC) No. 2082/92]. According to these specifications, the salinity of dry-cured hams should be under 15% of defatted dry matter. A correlation between water activity ( $a_w$ ) and water-holding capacity ( $R^2 = 0.59, p < 0.05$ ) and binding force (BF) was obtained, in the case of  $a_w$  ( $R^2 = 0.44, p < 0.05$ ) according to the expression  $\text{BF} = 37.35 - 38.52 (a_w)$ .

No information has been found related to changes in the binding parameters of restructured dry meat products that were processed using MTGase as cold-set binding. However, the increases observed in the binding force during the drying period (Fig. 2) could be related to the modifications in the rheological traits and the stability of covalent unions associated with the MTGase effect



**Fig. 4.** Scanning electron microscopy analysis (SEM) images, at  $\times 30$  (a, b) and  $\times 500$  (c, d) magnifications, of binding area from restructured dry ham elaborated according to WPS procedure after 0 (a, c) and 8 (b, d) weeks of drying. WPS: as indicated in Table 1.

(Yokoyama et al., 2004). The changes in textural profile probably depend on both water-holding capacity and state of proteins during dry-cured ham processing. Several authors have reported negative relationships between hardness (Monin, Talmant, Aillery, & Collas, 1995; Virgili, Parolari, Schivazappa, Soresi-Bordini, & Borri, 1995) and chewiness (Monin et al., 1995) and water content in several types of dry-cured ham. Furthermore, these authors (Virgili et al., 1995) found a positive correlation between hardness and salt concentration. It is assumed that hardness and chewiness increase during the initial steps of processing due to a decrease in the protein solubility and water content (Monin et al., 1997). MTGase is known to stabilize the meat portion unions by strong covalent [ $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lys] cross-links among myofibrillar structures (Yokoyama et al., 2004). When applying SDS–PAGE analysis (Jiang, Hsieh, Ho, & Chung, 2000), it was observed that after MTGase application, the bands corresponding to H-meromyosin disappeared and the bands corresponding to cross-linked polymers appeared. Our results could indicate that MTGase induces interactions or bonds between the meat surface proteins stabilizing the network during the salting and drying of the restructured dry ham manufacture.

### 3.3.2. Microstructure of the restructured dry ham binding area

The binding force of the restructured dry ham (WPS and WLS) may be correlated with the network structure. The images obtained by scanning electron microscopy (SEM) of the binding area of both WPS and WLS restructured dry hams differed only depending on the drying time (0 vs 8 weeks of drying) and the samples from the WPS (Fig. 4) and WLS (not shown) procedures showed similar microstructures. For this reason, only samples from WPS hams are reported in Fig. 4. The binding area microstructures of WPS hams at 0 (Fig. 4a and c) and 8 weeks (Fig. 4b and d) using SEM at  $\times 30$  (Fig. 4a and b) and  $\times 500$  magnifications (Fig. 4c and

d) are shown in Fig. 4. At  $\times 30$  magnifications, the WPS ham binding area at 0 and 8 weeks of drying time (Fig. 4a and b) showed a clear binding line between the meat surfaces. The binding area in samples WPS at 0 weeks of drying time was wider and more marked than these at 8 weeks. The drying produced a retraction of the binding area, resulting in a less visible binding structure at 8 weeks (Fig. 4b). These observations may be related with the images obtained with  $\times 500$  magnifications (Fig. 4c and d). The microstructure of the binding zone of the WPS ham at 0 weeks (Fig. 4c) presented a network with few filaments and little interaction. After 8 weeks of drying time the binding zone showed a well-structured matrix with more interconnections of thick strands (Fig. 4d). This fact may explain why the binding force increased (Fig. 2) along the drying time (between 0 and 8 weeks). These results may be due to an increase of covalent cross-links favoured by the increased concentration of MTGase and protein substrate associated with the modifications occurring during the initial stage of the drying process, i.e. an increase of salt concentration and a decrease in the protein solubility and water content (Monin et al., 1997).

## 4. Conclusions

The MTGase can be used for restructuring deboned pork leg to manufacture dry-cured ham on a practical scale since it provides enough stable cross-links in the course of the salting and drying processes. To obtain the highest binding force and rate, it is necessary, firstly, to treat the meat surface with a mixture of salts (NaCl including  $\text{KNO}_3$  and  $\text{NaNO}_2$ ) and, secondly, to bind with MTGase; this is then followed by vacuum packing of these meat portions covered in salt. This vacuum packing procedure allows simulta-

neous binding and salting processes to take place effectively in the manufacture of dry-cured ham.

## Acknowledgements

The authors are grateful for the financial support of projects AGL04-6773 and CARNISENUSA (CSD2007-00016), included in the CONSOLIDER-INGENIO 2010 issue (Ministerio de Educación y Ciencia). The Comunidad de Madrid has supported the projects CCG07-UCM/AGR-2640 and “TEMINYSA”(S-0505/AGR-0314). SEM facilities were provided by the CAI de Microscopía Electrónica “Luis Bru” of the UCM by Eugenio Baldonado.

## References

- Ando, H., Adachi, M., Umeda, K., Matsuura, A., Nonaka, M., Uchio, R., et al. (1989). Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganism. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53, 2613–2617.
- AOAC (1995). *Official methods of analysis* (16th ed.). Association of Official Analytical Chemists.
- Boles, J. A., & Shand, P. J. (1998). Effect of comminution method and raw binder system in restructured beef. *Meat Science*, 49, 297–307.
- Brondum, J., Munck, L., Henckel, P., Karlsson, A., Tornberg, E., & Engelsen, S. B. (2000). Prediction of water-holding capacity and composition of porcine meat with comparative spectroscopy. *Meat Science*, 55, 177–185.
- Cambero, M. I., López, M. O., de la Hoz, L., & Ordoñez, J. A. (1991). Restructured meat. Composition and binding-properties. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 31, 293–309.
- Causton, D. R., & Venus, J. C. (1981). *The biometry of plant growth*. London: Edward Arnold Ltd.
- Costa, M. R., Bergamin, W., Silveira, E. T. F., & Felício, P. E. (2008). Colour and texture profiles of boneless restructured dry-cured hams compared to traditional hams. *Scientia Agricola (Piracicaba, Braz.)*, 65, 169–173.
- Dondero, M., Figueroa, V., Morales, X., & Curotto, E. (2006). Transglutaminase effects on gelation capacity of thermally induced beef protein gels. *Food Chemistry*, 99, 546–554.
- European Commission (1999). Commission Regulation (EC) No. 2419/1999 of 12 November 1999 supplementing the Annex to Regulation (EC) No. 2301/97 on the entry of certain names in the Register of certificates of specific character provided for in Council Regulation (EEC) No. 2082/92 on certificates of specific character for agricultural products and foodstuffs. *Official Journal of the European Communities*, 291, 25–26.
- Elizalde, I. (2008). El jamón español se prepara para hablar mandarín. *Expansión, Edición impresa*. March 25.
- Flores, N. C., Boyle, E. A. E., & Kastner, C. L. (2007). Instrumental and consumer evaluation of pork restructured with activa (TM) or with fibrinex (TM) formulated with and without phosphate. *Lwt – Food Science and Technology*, 40, 179–185.
- Ghavi, B., Althen, T. G., & Rogers, R. W. (1987). Effects of tumbling at various speeds on some characteristics of restructured cured beef. *Journal of Food Science*, 52, 543–553.
- Herrero, A. M., de la Hoz, L., Ordoñez, J. A., Herranz, B., Romero de Ávila, M. D., & Cambero, M. I. (2008). Tensile properties of cooked meat sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) parameters and physico-chemical characteristics. *Meat Science*, 80, 690–696.
- Herrero, A. M., Ordoñez, J. A., Romero de Ávila, M. D., Herranz, B., de la Hoz, L., & Cambero, M. I. (2007). Breaking strength of dry fermented sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) and physico-chemical characteristics. *Meat Science*, 77, 331–338.
- Honikel, K. O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science*, 78, 68–76.
- Ionescu, A., Aprodu, I., Daraba, A., & Porneala, L. (2008). The effects of transglutaminase on the functional properties of the myofibrillar protein concentrate obtained from beef heart. *Meat Science*, 79, 278–284.
- Jiang, S. T., Hsieh, J. F., Ho, M. L., & Chung, Y. C. (2000). Microbial transglutaminase affects gel properties of gold threadfin-bream and pollack surimi. *Journal of Food Science*, 65, 694–699.
- Jimenez-Colmenero, F., Ayo, M. J., & Carballo, J. (2005). Physicochemical properties of low sodium frankfurter with added walnut: Effect of transglutaminase combined with caseinate, KCl and dietary fibre as salt replacers. *Meat Science*, 69, 781–788.
- Kauffman, R. G., Eikelenboom, G., van der Wal, P. G., Merkus, G., & Zaar, M. (1986). The use of filter paper to estimate drip loss of porcine musculature. *Meat Science*, 18, 191–198.
- Kuraishi, C., Sakamoto, J., Yamazaki, K., Susa, Y., Kuhara, C., & Soeda, T. (1997). Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking. *Journal of Food Science*, 62, 488–490 [515].
- Losantos, A., Sanabria, C., Cornejo, I., & Carrascosa, A. V. (2000). Characterization of Enterobacteriaceae strains isolated from spoiled dry-cured hams. *Food Microbiology*, 17, 505–512.
- Mandigo, R. W. (1988). Restructured meats. In R. Lawrie (Ed.), *Developments in meat science* (pp. 297–315). New York: Elsevier [4].
- Martín, A., Benito, M. J., Hernández, A., Pérez-Nevado, F., Córdoba, J. J., & Córdoba, M. G. (2008). Characterisation of microbial deep spoilage in Iberian dry-cured ham. *Meat Science*, 78, 475–484.
- Monin, G., Marinova, P., Talmant, A., Martín, J. F., Cornet, M., Lanore, D., et al. (1997). Chemical and structural changes in dry-cured hams (Bayonne hams) during processing and effects of the dehairing technique. *Meat Science*, 42, 29–47.
- Monin, G., Talmant, A., Aillery, P., & Collas, G. (1995). Effects on carcass weight and meat quality of pigs dehaired by scalding or singeing post-mortem. *Meat Science*, 39, 247–254.
- Paardekooper, E. J. C., & Wijngaards, G. (1988). *Composite meat product and method for the manufacture thereof*. International patent no. 8501333. Netherlands, issued May 3.
- Paarup, T., Nieto, J. C., Peláez, C., & Reguera, J. I. (1999). Microbiological and physico-chemical characterisation of deep spoilage in Spanish dry-cured hams and characterisation of isolated *Enterobacteriaceae* with regard to salt and temperature tolerance. *European Food Research and Technology*, 209, 366–371.
- Ramírez, J., Uresti, R., Téllez, S., & Vázquez, M. (2002). Using salt and microbial transglutaminase as binding agents in restructured fish products resembling hams. *Journal of Food Science*, 67, 1778–1784.
- Richard, F. J. (1959). A flexible growth function for empirical use. *Journal of Experimental Botany*, 10, 290–300.
- Santos, C., Hoz, L., Cambero, I., Cabeza, C., & Ordoñez, J. A. (2008). Enrichment of dry-cured ham with  $\alpha$ -linolenic acid and  $\alpha$ -tocopherol by the use of linseed oil and  $\alpha$ -tocopheryl acetate in pig diets. *Meat Science*, 80, 668–674.
- Vigneron, X. (1988). Restructuration des viandes. *Viandes Produits Carnés*, 9, 182–186.
- Virgili, R., Parolari, G., Schivazappa, C., Soresi-Bordini, C., & Borri, M. (1995). Sensory and texture quality of dry-cured ham as affected by endogenous cathepsin B activity and muscle composition. *Journal of Food Science*, 60, 1183–1186.
- Wijngaards, G., & Paardekooper, E. J. C. (1988). Preparation of a composite by means of an enzymatically formed protein gel. In B. Krol, P. S. van Roon, & J. H. Houben (Eds.), *Trends in modern meat technology* (2nd ed., pp. 125–130). Wageningen: Pudoc.
- Yokoyama, K., Nio, N., & Kikuchi, Y. (2004). Properties and applications of microbial transglutaminase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 447–454.

### **ARTÍCULO 3.2.**

**A study on the suitability of plasma powder for cold-set  
binding of pork and restructured dry ham**

**Meat Science. (2012). En revision.**



Ms. Ref. No.: MEATSCI-D-12-00191R1

Title: A study on the suitability of plasma powder for cold-set binding of pork and restructured dry ham

Meat Science

Dear Isabel,

Your submission entitled " A study on the suitability of plasma powder for cold-set binding of pork and restructured dry ham" will be handled by Editor David Hopkins, B. Agr.Sc., M. Agr. Sc., PhD.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/meatsci/>.

Your username is: [icambero@vet.ucm.es](mailto:icambero@vet.ucm.es)

If you need to retrieve password details, please go to:

[http://ees.elsevier.com/meatsci/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/meatsci/automail_query.asp)

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System

Meat Science





# A study on the suitability of plasma powder for cold-set binding of pork and restructured dry ham

M.D. Romero de Ávila, J.A. Ordóñez, R. Escudero, M.I. Cambero\*

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

## ABSTRACT

To determine the ability of cold-set binder plasma powder (PP) for manufacturing restructured deboned dry ham, the effect of meat pre-treatment and PP preparation on the binding rate ( $k$ ) and maximum binding force ( $BF_{max}$ ) of pork model systems and deboned ham were evaluated. In pork model systems, the highest values for  $k$  (about  $0.4 \text{ Ncm}^{-2}\text{h}^{-1}$ ) and  $BF_{max}$  (about  $2.5 \text{ Ncm}$ ) were obtained when powder or rehydrated plasma [in water or in NaCl aqueous solution at 0.5%] was applied onto the meat surface without additional pre-treatment or prior immersion in saline aqueous solution. Similar meat pre-treatment and PP preparation were used to restructure fresh deboned leg resulting in stable meat unions during salting and drying. An important increase in the binding force ( $BF_{max} > 10 \text{ Ncm}^{-2}$ ) occurred over the drying period (after 4 weeks). Scanning electron microscopy showed different morphologies of the binding area, mainly depending on whether powder or rehydrated plasma was used.

**Keywords:** Plasma powder; Pork; Cold-set binder; Binding parameters; Restructured dry ham; Microstructure

**Running title:** Suitability of plasma powder for dry ham restructuration

## 1. Introduction

Several countries, mainly in the Mediterranean area, manufacture dry-cured hams (Álvarez de la Puente, 2003). There is a great variety of dry-cured hams, differing in the pig breed, type of feed, meat weight, type of cut and processing conditions (Martín-Bejarano, 2001; Ockerman, Basu, León Crespo, & Céspedes, 2002; Ventanas, Ruiz, & Córdoba, 2001). In Spain dry-cured ham is manufactured from whole pork legs cutting at the level of the ischio-pubic symphysis, with foot and bone (Martín-Bejarano, 2001). The typical production process of Spanish dry-cured hams [e.g. *Serrano*, from white pig and processed in accordance with "Traditional Speciality Guaranteed (TSG)" (EC, 1999) and *Iberian*, from black pig corresponding to the Protected Designations of Origin (MAPA, 2007)] includes the following steps (Martín-Bejarano, 2001; Ventanas et al., 2001): salting, washing-brushing, rest or post-salting, drying-ripening and refinement by aging (cellar phase).

Traditionally, ripened ham was commercialized as a whole piece while nowadays the most successful products are the ready-to-eat formats and there has been a clear expansion of the market (about 73% for exports) for deboned dry-cured ham, either whole or as portions (200 – 500 g) or slices (Elizalde, 2008). The manufacture of dry-cured ham from fresh deboned leg offers advantages during production, storage and transport because it decreases the piece weight and volume in a quantity equivalent to the size of the bone. Deboned hams are the most suitable for cutting and slicing. All these facts highlight the motivation to develop an adequate procedure with which to manufacture dry-cured ham using deboned fresh pork legs.

Several non-meat ingredients or systems (such as alginates, blood clotting factors and enzyme binders) have been successfully used as cold meat binders in the manufacture of restructured meat products and to improve the stability, texture and consistency of meat and fish gels (Cambero, López, de la Hoz, & Ordóñez, 1991; Mandigo, 1988; Romero de Ávila, Ordóñez, De la Hoz, Herrero, & Cambero, 2010). These cold meat binders are able to establish interactions with myosystems, including proteins from the stroma (Mandigo, 1988; Cambero et al., 1991). There have been numerous studies (Kuraishi, Sakamoto, Yamazaki, Susa, Kuhara, & Soeda, 1997; Paardekooper, & Wijngaards, 1988; Wijngaards, & Paardekooper, 1988) with satisfactory results which

\* Author to whom the correspondence should be addressed: M. I. Cambero, Departamento Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense. 28040 Madrid. Spain. Phone: +34 913943745; Fax: +34 913943743 E-mail: icambero@vet.ucm.es (M.I.Cambero)



confirm that binding systems develop enough bonds to eliminate the cavities produced in meat pieces during the deboning process. In the light of these results, there is reason to believe that a similar strategy may be used to restructure deboned pork leg, which could then be used to produce dry-cured ham. In a previous work, (Romero de Ávila et al., 2010) the viability of using microbial transglutaminase (MTGase) as a cold-set binder for restructuring and manufacturing deboned dry ham was assessed.

Recently, plasma powder, from bovine and porcine blood, has been successfully employed as a cold-set binding agent.

For many years, several meat products with added animal blood or plasma proteins have been produced and consumed in different countries without adverse effect (EFSA, 2005; USDA/FSIS, 2005). Blood plasma is not considered to be a food additive by the European Regulation (EC) No. 1333/2008 (European Parliament and the Council of the European Union, 2008). This blood derived product is obtained from blood and hygienically collected in slaughterhouses under veterinary inspection (European Parliament and the Council of the European Union, 2004a,b). Plasma is a multifunctional ingredient (Tarté, 2009), including gelling and binding activity. Several plasma derived products (such as thrombin:fibrinogen, hydrolysates, plasma powder) can be used as additives or ingredients in the meat industry. Governmental regulation concerning the application, status and labelling of plasma proteins and blood derived products varies slightly from country to country (EFSA, 2005; European Parliament, 2010; Ofori & Hsieh, 2012; USDA/FSIS, 1995; 2005).

The plasma powder product as a cold-set binding agent, is prepared following the method described by Roodink, & Zuidweg (2003). With this procedure, a plasma protein concentrate is obtained which contains a complex mix of proteins such as serum albumin, globulins and fibrinogen (at least 1% of the weight) (Roodink, & Zuidweg, 2003; Herrero, De La Hoz, Ordóñez, Castejón, Romero de Ávila, & Cambero, 2009a). Finally, the concentrate is spray-dried to form a powder (Roodink, & Zuidweg, 2003; Ofori, & Hsieh, 2012) intended for use in foodstuffs, in such a manner that the temperature of the product is maintained at less than 60 °C. These conditions allow the natural functions and activities of fibrinogen and the other proteins and enzymes of the blood plasma to be maintained. This blood plasma powder offers several advantages over other cold-binding systems that are also of blood origin (such as the combination of fibrinogen and thrombin solutions). Plasma powder is a single-component system that is easily stored and preserved; and no changes in colour or

flavour have been detected in meat products formulated with this plasma powder (Jantawat, Chinprahast, & Kristavee, 1996; Ofori, & Hsieh, 2012).

Raman spectroscopy has been used (Herrero, Cambero, Ordóñez, de la Hoz, & Carmona, 2009b) to study the protein structural changes that occur when plasma powder is added as a cold-set binding agent to meat systems. Evidence shows that the addition of rehydrated plasma powder to meat batter produced an increase of turns (sum of  $\beta$  and  $\gamma$  turns) and unordered structure (Herrero et al., 2009b). Furthermore, magnetic resonance imaging has shown that the addition of plasma powder, without heat treatment, provides high mechanical stability to meat emulsion (Herrero et al., 2009a).

The production of dry-cured ham essentially consists of salt diffusion into the meat and progressive dehydration. However, these phenomena may affect the action of the plasma powder (Herrero et al., 2009 a,b; Gentry, 2004; Othner & Kosow, 1980; Weisel, 2005). As far as the authors are aware, no study has been found related to the use of this cold-set binder in dry-cured ham processing. The main objective of this work was to assess the efficacy of plasma powder to restructure fresh deboned pork leg either before or after a salting and drying process in order to ultimately produce deboned dry-cured ham. Likewise, the microstructure of the resulting binding surfaces was analyzed by scanning electron microscopy.

## 2. Material and methods

### 2.1. Experimental layout

Two types of pork samples were considered: (1) pork model systems and (2) fresh deboned whole leg. A dried plasma protein preparation elaborated from porcine blood plasma with increased fibrinogen concentration (Roodink, & Zuidweg, 2003, Herrero et al., 2009a,b) was used. This plasma product was supplied by Sonac Bv (Loenen, Netherlands) and is commercialized as plasma powder FG. The variables (meat pre-treatment and plasma powder preparation) used to obtain the pork model systems are described in Table 1. The experiments were carried out at three different times (February, May and October). In the three cases, each of the individual pork model systems was elaborated in triplicate (a different pork piece being used in each case).

### 2.2. Meat preparation and treatment

Fresh pork (*M. biceps femoris*) was purchased from a local abattoir at 48 h *post mortem* to elaborate the model systems. To achieve homogenous samples,

only meat from female white pigs (Landrace x Large White) fed in confinement with a commercial diet were acquired. Animals were stunned, slaughtered and exsanguinated at a local slaughterhouse at 100.3±8.01 kg liveweight (about 6 months of age).

The models systems were elaborated by cutting the meat into portions (cubes of about 10 cm wide) and the visible fat and connective tissue were removed. Then, the meat was subjected to one of the pre-treatments described in Table 1: U, fresh samples without additional treatment; I, samples were immersed in a saline (NaCl with about 200 ppm of KNO<sub>3</sub> and 100 ppm of NaNO<sub>2</sub>) aqueous solution (3%, w/v) for 10 min at 4°C, after which the excess fluid was removed with a filter paper; and SS, a mixture of salts (NaCl with 200 ppm of KNO<sub>3</sub> and 100 ppm of NaNO<sub>2</sub>) was evenly spread on the meat surface. After 10 min of setting time, the pork cubes were washed with the same saline aqueous solution (3 %, w/v) then the excess liquid was removed using a filter paper.

**Table 1**  
Elaboration procedures used for the preparation of the pork model systems and to restructure fresh deboned legs

Procedures	Symbol
<b>1. Meat pre-treatment</b>	
Untreated	U
Immersed in aqueous solution of NaCl 3% (w/v) for 10 minutes	I
Evenly distributing the salt (1 minute) on the surfaces, setting time 10 minutes, and washed with aqueous solution of NaCl 3% (w/v)	SS
<b>2. Preparation of the plasma powder</b>	
2.1. Powder	PP
2.2. Rehydrated	
Plasma powder/water (3/8 w/v)	PPW0
Plasma powder/0.5% NaCl in aqueous solution (3/8 w/v)	PPW0.5
Plasma powder/1.5% NaCl in aqueous solution (3/8 w/v)	PPW1.5
Plasma powder/3% NaCl in aqueous solution (3/8 w/v)	PPW3
<b>3. Mixture of meat batter and plasma powder</b>	
<sup>a</sup> Meat batter/ PPW0 (6/4 w/w)	ME0PPW0
<sup>b</sup> Meat batter/PPW0 (6/4 w/w)	ME2PPW0

<sup>a</sup> Meat batter with water (9/1 w/w)

<sup>b</sup> Meat batter with NaCl aqueous solution (9/1 w/w) to obtain a final salt concentration of 2%.

### 2.3. Preparation of plasma powder

Different procedures were used to apply plasma powder onto binding meat surface (Table 1): powder (PP), the powder rehydrated in distilled water (PPW0) and in a NaCl aqueous solution (w/v) at 0.5 (PPW0.5), 1.5 (PPW1.5) and 3 % (PPW3). The proportion of plasma powder and liquid was 3/8 (w/v).

In addition, two meat batters and rehydrated plasma powder (ME0PPW0 and ME2PPW0) were prepared (Table 1). These mixtures were performed using the following procedure: pork was pre-cut into small portions. Then, the meat was chopped for 1 min at 1200 rpm in a vertical cutter-mixer with blend blades (Robot Coupe R 8 m.m., Vincennes Cedex, France with two blend blades) equipped with a vacuum system. Following this, water (ME0) or NaCl aqueous solution at 0 ± 1 °C was added to the chopped meat and mixed for 1 minute at 1500 rpm to

get a homogeneous mixture. The NaCl aqueous solution added was prepared to obtain a 2 % salt concentration in the meat batter mixture (ME2). In both mixtures (ME0 and ME2), the proportion of meat and liquid was 9/1 w/w. Finally, a PPW0 mixture was added (meat batter/PPW0, 6/4, w/w) to obtain the ME0PPW0 and ME2PPW0 mixtures (Table 1). These mixtures were carefully prepared for 1 minute at the lower speed (300 rpm). The process was performed while controlling the temperature, using thermocouples (Yokogawa Hokushin Electric YEW, Mod. 3087, Tokyo, Japan), to maintain the product between 0-2 °C and in vacuum conditions.

### 2.4. Preparation of the pork model system

One surface of a previously treated (U, I or SS) meat piece was covered with a plasma powder preparation (PP, PPW0, PPW0.5, PPW1.5, PPW3, ME0PPW0 or ME2PPW0) and immediately was placed in contact with a similarly pre-treated (U, I or SS) pork portion surface. The resulting model system (meat/cold-set binding/meat, M/CSB/M) was packed into plastic bags of low permeability (diffusion coefficient of 35 cm<sup>3</sup>/24 h m<sup>2</sup> bar to oxygen and 150 cm<sup>3</sup>/24 h m<sup>2</sup> bar to carbon dioxide) in a high vacuum machine (750/400 model, Vapta, SL, Spain) until a vacuum of 20 kPa. The pork model systems were stored at 4 °C during the first 34 hours (binding period). Following the different binding periods, the pork model systems (M/CSB/M) were removed from the plastic containers and the analyses were performed.

### 2.5. Processing of fresh deboned leg

Fresh deboned pork legs were purchased 48 h *post mortem* at a local meat processor. The legs were obtained from female white pigs with the same characteristics (feeding system, slaughter weight, etc.) specified in 2.2. The variables (meat pre-treatment and plasma powder preparation) used to prepare the pork model system (Table 1) were also considered to restructure the deboned pork leg. Five deboned legs were used for each restructured dry ham manufacturing process. The distal meat portions and external flaps or hanging were removed from the deboned pork legs to obtain homogeneous pieces of about the same cross-section. Thus, deboned pork portions weighing about 3 kg were obtained and processed.

The exposed muscle surfaces resulting from the deboning process were treated with procedures U, I or SS (Table 1). To restructure the fresh deboned legs, a preparation of plasma powder (PP, PPW0, PPW0.5, PPW1.5, PPW3, ME0PPW0 or ME2PPW0) was gently applied onto the pre-treated (U, I or SS)

uncovered muscle surfaces. The pork legs were then restructured by placing in contact parallel meat surfaces and, afterwards, were immediately vacuum packed (20 kPa) into plastic bags and stored at 4 °C during the binding time. At the end of the binding period, the restructured deboned legs (RDL) were removed from the plastic bags and the pieces were covered with a dry mixture of salts (salting). The mixture of salts (NaCl with 200 ppm of KNO<sub>3</sub>, and 100 ppm of NaNO<sub>2</sub>) was similar to that used for dry-cured ham manufacture and the amount used was equivalent to 2% of the weight of the pork model complex (Santos, Hoz, Cambero, Cabeza, & Ordóñez, 2008). The salting period lasted 0.75 days per kg of restructured leg. At the end of the salting period (about 2.25 days), the excess salt was removed from the surfaces (post-salting restructured deboned legs, PSRDL) and dried for up to 8 weeks at 10 °C and 80% relative humidity. The final product was named restructured deboned dry ham (RDDH).

## 2.6. Physico-chemical determinations

The dry matter (oven air-drying method) and ash (muffle furnace) were analyzed following AOAC (1995) procedures. The salt content of the PSRDL and RDDH were estimated by subtracting the ash content of the fresh meat from the content of salted samples. To calculate the defatted dry matter, the fat content was estimated by the Bligh and Dyer method (Santos et al., 2008). The pH and water activity ( $a_w$ ) were determined at 25 °C using a Crison Digit-501 pH meter (Crison Instruments LTD, Barcelona, 224 Spain) and a Decagon CX1 hygrometer (Decagon Devices Inc., Pullman, WA) respectively. The water-holding capacity (WHC) was measured by using the Carver Press Method (Kauffman, Eikelenboom, van der Wal, Merkus, & Zaar, 1986). For that, 0.3 g sample was pressed onto an oven-dried Whatman 125-mm filter paper. The WHC values were calculated as the percentage of water retained when compared to the water content in the product before pressing.

The  $a_w$  and the WHC were determined immediately after meat pre-treatment (U, I, SS) and before the reparation of the pork model systems. The  $a_w$  was also determined at the end of the salting period and during the drying period of RDDH production. Four replicates of each sample were obtained.

## 2.7. Binding force determination

The strength required per surface unit (Ncm<sup>-2</sup>) to separate the meat portions bound by the adhesion (in M/CSB/M, RDL, PSRDL and RDDH) originating from the plasma powder binding action (binding force, *BF*) was determined using a T.A.XT2i SMS Stable Micro

System Texture Analyser (Stable Microsystems Ltd., Surrey, England) with Texture Expert programmes. A load cell of 5 kg was employed.

Five rectangular slices (7 cm long, 2.5 cm wide and 0.5 cm thick) from each pork model system (M/CSB/M) were cut using an electric meat slicer machine (Slicers 243 ES 300, Beckers Italy) taking care to maintain the plasma powder union on the transversal central line of the meat rectangle. For analysis, one tensile grip (A/TGT) was fixed onto the base of the textural analyser, while the other one was attached to the load cell. Initial grip separation was 12.5 mm and crosshead speed was 1.0 mm/s until rupture (Herrero, Ordóñez, Romero de Ávila, Herranz, de la Hoz, & Cambero, 2007). Each sample was placed between both tensile grips on the textural analyzer. Rupture force was taken as the maximum force peak height (N) required for breaking the sample. The *BF* (Ncm<sup>-2</sup>) was obtained by dividing the rupture force by the cross-sectional area (thickness x width) of the portions.

The *BF* analyses of the M/CSB/M were performed at intervals of 30 minutes during a period of six hours and then every hour afterwards.

To determine the *BF* of the restructured deboned pork pieces (RDL, PSRDL and RDDH), they were cut into cubes in which the plasma powder suture was located approximately at the central line. Ten rectangular slices (about 7 cm long, 2.5 cm wide and 0.5 cm thick) were obtained from each cube using an electric rotary food processor, endeavouring at all times to maintain the plasma powder union on the transversal central line of the sample. The materials and analysis conditions were similar to those previously described for determining the *BF* of the pork model complex.

The *BF* analyses of the PSRDL were performed at the end of the salting period, immediately after salt removal from the meat surface. The *BF* determinations of the RDDH were carried out every seven days during the drying period (8 weeks).

In the case of M/CSB/M, and the restructured deboned leg during drying, a non-linear regression was performed in order to fit the *BF* as a function of the binding time (SPSS 15.0 for Windows). The logistic model permitted the maximum binding force ( $BF_{max}$ ) to be obtained. The binding rate ( $k$ ) was calculated according to Richards function (Causton, & Venus, 1981; Richard, 1959); it assumes that binding force (*BF*) increases linearly in time ( $t$ ) from an initial value ( $BF_{ini}$ ) to a maximum value ( $BF_{max}$ ).

$$dBF/dt = k [1 - (\ln BF_{ini} / \ln BF_{max})]$$

## 2.8. Scanning electronic microscopy analysis (SEM)

The SEM performed on both the meat model systems and the restructured deboned dry hams

(RDDH) were carried out in the “Centro de Microscopia y Citometria de la Universidad Complutense de Madrid”. Samples were cut into cubes (0.5 cm side) which were fixed in a 4 % glutaraldehyde buffered physiological solution for 4 hours at 4 °C. Then, samples were dehydrated by gradually increasing ethanol solutions from 30% to 100%, after which they were dried in liquid critical-point carbon dioxide, and subsequently coated with graphite and gold for analysis in a scanning electron microscope (JEOL, mod. JSM-6400) equipped with an Energy Dispersive X-ray (EDX) detector. Samples were kept in a desiccator until the time of visualization. The samples were observed from x30 up to x5000 magnification. A minimum of five representative pictures at each magnification were taken for each sample at a voltage of 20 kV, using an Inca Oxford image capture system (Oxford Instruments Analytical Ltd., High Wycombe, UK).

## 2.9. Experimental desing and Statistical analysis

Experimental design and statistical analysis was carried out using a Statgraphics Plus version 5.0. The experimental units corresponded to the individual meat model system (M/CSB/M) and restructured deboned pork piece (RDL, PSRDL and RDDH). The effects of the meat pre-treatment (three levels: U, I and SS) and the procedure for the preparation of the plasma powder [five levels: PP, PPW0, PPW0.5, PPW1.5, and PPW3] (as indicated in Table 1) on the binding parameters ( $k$  and  $BF_{max}$ ) of pork model systems were analysed by employing a factorial experimental design (3 x 5). The data were analysed by means of a linear model for two-way factorial analysis:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

where  $Y$  is the data observed,  $\mu$  is the general mean,  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $(\alpha\beta)$  are the main effects and  $\varepsilon$  is the residual error.

Fifteen combinations of the two variables or factors (meat pre-treatment and plasma powder preparation) were replicated in triplicate for meat model system and in quintuplicate to restructure deboned pork piece. In the case of pork model systems, the same procedure was carried out at three different times (as mentioned in point 2.1). Results for each treatment were averaged and used for the statistical analysis.

To check the normal distribution (90% confidence) of data, the Shapiro-Wilk's test was applied. When data fitted the normal distribution, the one-way ANOVA analysis was performed and Duncan's test for multiple mean comparisons procedure was performed to determine which means

are significantly different from which others (at 95% of confidence level). When data did not fit the normal distribution, the Kruskal-Wallis test was used to test the null hypothesis that the medians of the variable within each of the levels in the samples were the same.

Two-way ANOVA was used to determine simultaneous effects produced by the factors or variables (meat pre-treatment and preparation of the plasma powder) on binding parameters ( $k$  and  $BF_{max}$ ) of the pork model systems.

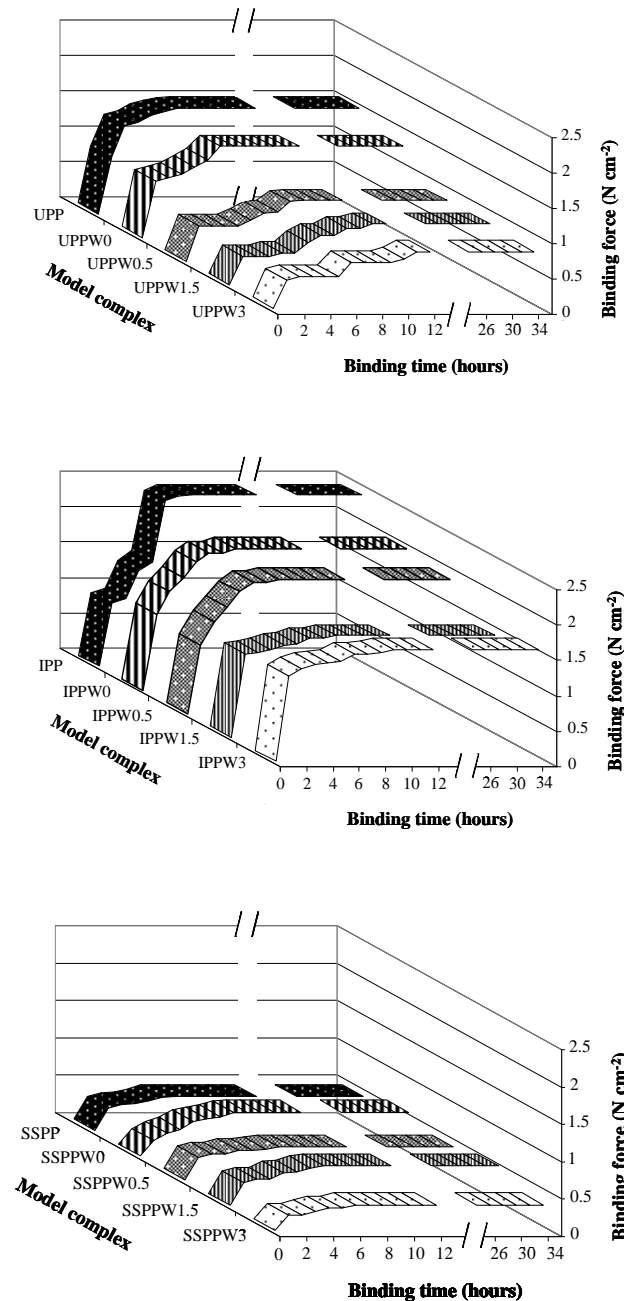
## 3. Results and discussion

### 3.1. Experiments with pork model systems

An initial study in meat model systems (M/CSB/M) was conducted to establish the effect of the selected factors (meat pre-treatment and the procedure for the preparation of the plasma powder, Table 1) on the binding rate and bonding force when plasma powder is used as a cold set binding agent. The meat used for this study had similar pH values, around  $5.6 \pm 0.4$ . The water content,  $a_w$  and the WHC of the fresh untreated meat (U) were:  $76.52 \pm 1.24\%$ ,  $0.981 \pm 0.003$  and  $47.64 \pm 1.24\%$ , respectively. A significant effect ( $p < 0.05$ ) of the meat surface pre-treatment on both  $a_w$  and WHC was observed. The even distribution of a mixture of salts on the meat surface (SS procedure, Table 1) caused the lowest ( $p < 0.05$ )  $a_w$  ( $0.900 \pm 0.002$ ). However, the meat immersion in a saline aqueous solution for 10 min and the subsequent removal of excess solution (I procedure, Table 1) showed similar values of  $a_w$  ( $0.981 \pm 0.001$ ) to the untreated samples (U). These results may be associated with the different salt concentration effects on the meat surface. As is well known, higher salt concentrations result in more water molecules being strongly bound to salts (Fennema, 1993; Machado, Coimbra, Garcia Rojas, Minim, Oliveira, & Sousa, 2007).

After the SS procedure was applied, the meat portions showed the highest WHC ( $50.92 \pm 4.17\%$ ); this was probably because of the even distribution of salt on the meat surface, and the subsequent washing with the saline aqueous solution which favoured salt penetration into the meat, resulting in swelling of the myofibrils (Hamm, 1960). However, the meat surface may present some protein aggregation and precipitation due to the high salt concentration during the initial even distribution of salt on the meat surface. Several authors (Chou, & Morr, 1979) have reported that if the concentration of neutral salts is high (greater than 0.6 M), the solubility of the protein is reduced, which could lead to its aggregation and precipitation. The meat portion treated by procedure I (Table 1) showed ( $p < 0.05$ ) the significantly lowest

WHC ( $30.81 \pm 1.04\%$ ). This result was probably due to the 10 min immersion producing an increased water content in the meat surface. However, most of the water was held only by surface forces. This situation may suggest an increase in the free water available (Fennema, 1993).



**Fig. 1.** Binding force ( $\text{N cm}^{-2}$ ) development in meat model systems as affected by the meat treatment and the plasma powder preparation condition.

Meat model system: U: model prepared with untreated meat; I: model prepared with meat immersed in aqueous solution of a mixture of salts ( $\text{NaCl}$  with 200 ppm of  $\text{KNO}_3$ , and 100 ppm of  $\text{NaNO}_2$ ) at 3% (w/v) for 10 min; SS: model prepared with salted meat [mixture of salts ( $\text{NaCl}$  with 200 ppm of  $\text{KNO}_3$ , and 100 ppm of  $\text{NaNO}_2$ ) was evenly distributed on the binding surface which was then washed with aqueous solution of the mixture of salts at 3% (w/v)]; PP: model prepared using plasma powder; PPW: model prepared using rehydrated plasma powder (3/8, w/v) in water (PPW0), in aqueous solution of  $\text{NaCl}$  0.5 % (PPW0.5), 1.5 % (PPW1.5) and 3 % (PPW3).

Figure 1 shows the development of the  $BF$  ( $\text{Ncm}^{-2}$ ) during the binding time (up to 34 hours) of different pork model systems (M/CSB/M) prepared according to the variables reported in Table 1. The results allowed the maximum binding force ( $BF_{max}$ ) to be obtained, after which the binding rate ( $k$ ) could be determined (Tables 2 and 3). In general, a setting time in the range of 5 -10 hours was enough to reach the  $BF_{max}$  in the different types of pork model systems (Figure 1). After the binding time, the  $BF$  was maintained relatively stable over time. The lowest  $BF$  was observed for M/CSB/M in which the meat surface was previously treated with the SS procedure (Table 1); this is probably because these meat model systems have features that are inadequate for the cross-linking reaction when plasma powder is used as the cold-set binding agent.

The  $BF$  detected in the different systems (M/CSB/M) may be attributed to the three-dimensional network formed throughout the process of fibrin polymerization, which is responsible for the mechanical properties of the fibrin gels or clots (Herrero et al., 2007; Weisel, 2004). Several authors (Ryan, Mockros, Weisel, & Lorand, 1999) have described a high rigidity and stiffness in fibrin clots.

Both binding parameters,  $k$  ( $\text{Ncm}^{-2}\text{h}^{-1}$ ) and  $BF_{max}$  ( $\text{Ncm}^{-2}$ ), were significantly affected ( $p < 0.05$ ; two-way ANOVA) by the pre-treatment of the meat surfaces and the procedure followed for the preparation of plasma powder (Table 2). The meat pre-treatment showed the maximum effect in both binding parameters [F-ratio 12.78 ( $p = 0.0000$ ) and 62.79 ( $p = 0.0000$ ), for  $k$  and  $BF_{max}$ , respectively]. A significant ( $p \leq 0.05$ ) interaction (Table 2) was found among the two factors examined in relation to  $k$ , but not in relation to  $BF_{max}$  ( $p > 0.05$ ). Thus, the effect of the meat pre-treatment on the  $BF_{max}$  between fresh meat surfaces originated by plasma powder is independent of the procedures followed to prepare the binding agent.

**Table 2**

Effect of meat treatment and plasma powder preparation on binding rate ( $\text{N cm}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) and maximum binding force ( $\text{N cm}^{-2}$ ) of pork model systems bound using plasma powder as cold-set binding agent, as determined by two-way ANOVA

Factors*	Binding rate ** ( $k$ )		Maximum binding force ( $BF_{max}$ )	
	p-value	F-Ratio	p-value	F-Ratio
Meat treatment: A	0.0000	12.78	0.0000	62.79
Preparation of plasma powder: B	0.01	3.67	0.004	4.93
<i>Interactions</i>				
A vs B	0.01	3.50	0.18	1.55

\*As indicated in Table 1

\*\*Binding rate ( $k$ ) was calculated according to Richard's function assuming that binding force ( $BF$ ) increased linearly in time ( $t$ ) from an initial value ( $BF_{ini}$ ) to a maximum value ( $BF_{max}$ ).

$$dBF/dt = k [1 - (\ln BF_{ini} / \ln BF_{max})]$$

When the data concerning the binding parameters ( $k$  and  $BF_{max}$ ) were grouped according to meat pre-treatment, (Table 1) significant effects were observed ( $p < 0.0000$ ; one-way ANOVA) for both binding parameters. The highest values of  $k$  and  $BF_{max}$  were obtained when the meat was immersed in salt solution (I) followed by those obtained for untreated meat (U) and the SS procedure (I > U > SS). The mean values were:  $0.22 \pm 0.08$ ;  $0.17 \pm 0.06$  and  $0.06 \pm 0.02$ , respectively for  $k$  and  $1.73 \pm 0.56$ ;  $1.11 \pm 0.41$  and  $0.47 \pm 0.13$  for  $BF_{max}$ . These results indicates that the stronger binding parameters are obtained when processed meat had high  $a_w$  and there was free water available (low WHC). On the other hand, the preparation of plasma powder (PP, PPW0, PPW0.5, PPW1.5 and PPW3) only showed a significant effect for  $k$  ( $p < 0.01$ ), with values in the following sequence:

PP ( $0.24 \pm 0.06$ )  $\geq$  PPW0 ( $0.19 \pm 0.05$ ); PP ( $0.24 \pm 0.06$ ) > PPW0.5 ( $0.14 \pm 0.05$ ), PPW1.5 ( $0.10 \pm 0.03$ ) and PPW3 ( $0.09 \pm 0.03$ ); and PPW0 = PPW0.5 = PPW1.5 = PPW3. When the binding agent was applied on the meat surface as a powder, the  $k$  values ( $0.24 \pm 0.06$ ) were higher ( $p < 0.01$ ) than those obtained for the rehydrated binding agent ( $0.13 \pm 0.04$ ) (powder vs rehydrated). These results are probably due to a greater plasma concentration on the meat surface when using the plasma powder. However, the  $BF_{max}$  values were not affected ( $p > 0.05$ ) by the plasma powder preparation. These results indicated that similar maximum binding forces could be achieved using either type of plasma powder preparation, although the binding process was faster when the PP (plasma powder) or PPW0 (rehydrated without salt addition) procedures were used.

**Table 3**

Binding rate ( $k$ ) and maximum binding force ( $BF_{max}$ ) reached by pork samples using plasma powder as cold-set binding during the binding, after salting (post-salting) and drying periods

Model complex	Pork model system		Processing of deboned leg		
	Binding Period (0 - 24 hours)		Post-salting (0.75 days /kg)	Drying period (4 weeks)	
	$k$ ( $N\ cm^{-2}\ h^{-1}$ )	$BF_{max}$ ( $N\ cm^{-2}$ )	$BF_{max}$ ( $N\ cm^{-2}$ )	$k$ $10^2(N\ cm^{-2}\ h^{-1})$	$BF_{max}$ ( $N\ cm^{-2}$ )
UPP	$0.28 \pm 0.06a,b$	$1.51 \pm 0.31b$	$3.63 \pm 0.53a$	$1.72 \pm 0.52b$	$10.63 \pm 1.57a,b$
UPPW0	$0.25 \pm 0.05b$	$1.29 \pm 0.43\ b,c$	$3.11 \pm 0.25a$	$1.76 \pm 0.58a,b$	$10.22 \pm 1.75a,b$
UPPW0.5	$0.11 \pm 0.02d$	$0.86 \pm 0.36b,c$	$2.08 \pm 0.22b$	$2.73 \pm 0.46a$	$12.73 \pm 1.19a$
UPPW1.5	$0.09 \pm 0.03d,e$	$0.86 \pm 0.31b,c$	$2.06 \pm 0.16b$	$2.51 \pm 0.51\ a,b$	$11.87 \pm 1.97\ a,b$
UPPW3	$0.08 \pm 0.02e$	$0.81 \pm 0.27c$	$1.94 \pm 0.29b$	$1.45 \pm 0.42b$	$7.71 \pm 2.19a,b$
IPP	$0.37 \pm 0.05a$	$2.40 \pm 0.26a$	$2.64 \pm 0.78a,b$	$1.68 \pm 0.37b$	$9.64 \pm 1.43a,b$
IPPW0	$0.25 \pm 0.09a,b$	$1.98 \pm 0.30a,b$	$2.18 \pm 0.57b$	$1.33 \pm 0.44b$	$7.66 \pm 1.51a,b$
IPPW0.5	$0.29 \pm 0.09a,b$	$1.89 \pm 0.41a,b$	$2.08 \pm 0.43b$	$1.33 \pm 0.42b$	$7.47 \pm 1.31b$
IPPW1.5	$0.14 \pm 0.04c,d$	$1.43 \pm 0.34b$	$1.57 \pm 0.61b,c$	$2.08 \pm 0.35a,b$	$9.28 \pm 1.21a,b$
IPPW3	$0.15 \pm 0.04c,d$	$1.57 \pm 0.44b$	$1.73 \pm 0.51c$	$2.17 \pm 0.41a,b$	$10.04 \pm 1.67a,b$
SSPP	$0.07 \pm 0.02e,f$	$0.46 \pm 0.10d$	$0.34 \pm 0.13e$	n.p	n.p
SSPPW0	$0.07 \pm 0.02e,f$	$0.58 \pm 0.15c,d$	$0.62 \pm 0.15d$	n.p	n.p
SSPPW0.5	$0.05 \pm 0.01f$	$0.45 \pm 0.10d$	$0.37 \pm 0.09e$	n.p	n.p
SSPPW1.5	$0.07 \pm 0.02e,f$	$0.53 \pm 0.16c,d$	$0.57 \pm 0.08d$	n.p	n.p
SSPPW3	$0.05 \pm 0.01f$	$0.34 \pm 0.09d$	$0.24 \pm 0.09e$	n.p	n.p
UME0PPW0	$0.07 \pm 0.02e,f$	$0.61 \pm 0.20c,d$	$0.92 \pm 0.26c$	$0.31 \pm 0.09c$	$2.07 \pm 0.75c$
UME2PPW0	$0.08 \pm 0.01e$	$0.66 \pm 0.15c,d$	$0.95 \pm 0.24c$	$0.22 \pm 0.08c$	$1.85 \pm 0.80c$
IME0PPW0	$0.06 \pm 0.02e,f$	$0.60 \pm 0.20c,d$	$0.90 \pm 0.18c$	$0.26 \pm 0.06c$	$1.87 \pm 0.55c$
IME2PPW0	$0.08 \pm 0.02e$	$0.67 \pm 0.15c,d$	$0.97 \pm 0.11c$	$0.13 \pm 0.08c$	$1.45 \pm 0.31c$

Meat model system: U: model prepared with untreated meat; I: model prepared with meat immersed in aqueous solution of a mixture of salts (NaCl with 200 ppm of  $KNO_3$ , and 100 ppm of  $NaNO_2$ ) at 3% (w/v) for 10 min; SS: model prepared with salted meat [mixture of salts (NaCl with 200 ppm of  $KNO_3$ , and 100 ppm of  $NaNO_2$ ) was evenly distributed on the binding surface which was then washed with aqueous solution of the mixture of salts at 3% (w/v)]; PP: model prepared using plasma powder; PPW: model prepared using rehydrated plasma powder (3/8, w/v) in water (PPW0), in aqueous solution of NaCl 0.5 % (PPW0.5), 1.5 % (PPW1.5) and 3 % (PPW3); ME0: meat batter with water (9/1 w/w) and ME2: meat batter with NaCl aqueous solution (9/1, w/w) to obtain a final salt concentration of 2 %.

n.p: not processed.

a, b, c, d, e, f: Different letters in the same column for binding rate or maximum binding force values indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

The effects of the factors studied on the binding parameters are reflected in the results shown in Table 3. Given the effect of the interaction between meat pre-treatment and plasma powder preparation factors on the binding rate, when the results of this parameter ( $k$ ) were compared for all meat model systems (M/CSB/M), the highest ( $p < 0.05$ ) values (about  $0.3 - 0.37 \text{ N cm}^{-2}\text{h}^{-1}$ ) were reached by the pork model systems UPP [elaborated with meat (without external treatment) bound with plasma powder] and those elaborated with meat immersed in a saline (NaCl with about 200 ppm of  $\text{KNO}_3$  and 100 ppm of  $\text{NaNO}_2$ ) aqueous solution for 10 min at  $4^\circ\text{C}$  (Table 1) bound with plasma powder (IPP) or with plasma powder rehydrated in distilled water (IPPW0) and in a NaCl aqueous solution (w/v) at 0.5 (PPW0.5). These last pork model systems also showed the highest  $BF_{\max}$  (about  $2 - 2.4 \text{ Ncm}^{-2}$ ). In general, the pork model systems elaborated with meat pre-treated with the SS procedure (Table 1), independent of the plasma powder preparation (powder, rehydrated with and without saline solution), showed (Table 3) the lowest  $k$  and  $BF_{\max}$  ( $p < 0.05$ ). These results suggest that the most appropriate procedure for restructuring fresh pork using plasma powder would be the preliminary meat treatment by immersion in the mentioned afore saline solution (I procedure, Table 1). Bonding of the meat surfaces may be achieved by applying the plasma as a powder, rehydrated in water, or in a NaCl aqueous solution at 0.5%. A similar plasma powder preparation procedure (mainly powder and rehydrated without salts) may be successfully followed to bond untreated meat surface (U), as shown in Table 3. Bearing in mind the meat pre-treatment for each type of pork model system, the lowest values for  $k$  and  $BF_{\max}$  (Table 3) were obtained when the plasma powder was rehydrated with the aqueous solution with the highest salt concentration (1.5 and 3 %). These results suggest that there is a decreased binding effectiveness of the plasma powder during the binding period by the presence of salt (NaCl), which may be associated with the findings of several authors (Papi, Arcovito, De Spirito, Amiconi, Bellelli, & Boumis, 2005; Standeven, Ariëns, & Grant, 2005; Vindigni, & Di Cera, 1996) on fibrin polymerisation since the plasma powder used in their work also increased the fibrinogen concentration. These authors have explained the role of chloride ions as a basic physiological modulator of both fibrin polymerization, and fibrin gel formation. They reported that chloride ions specifically bind to the fibrin fibres and oppose the lateral aggregation of protofibrils, resulting in thinner fibres and impeding fibrin polymerisation and, in turn, preventing

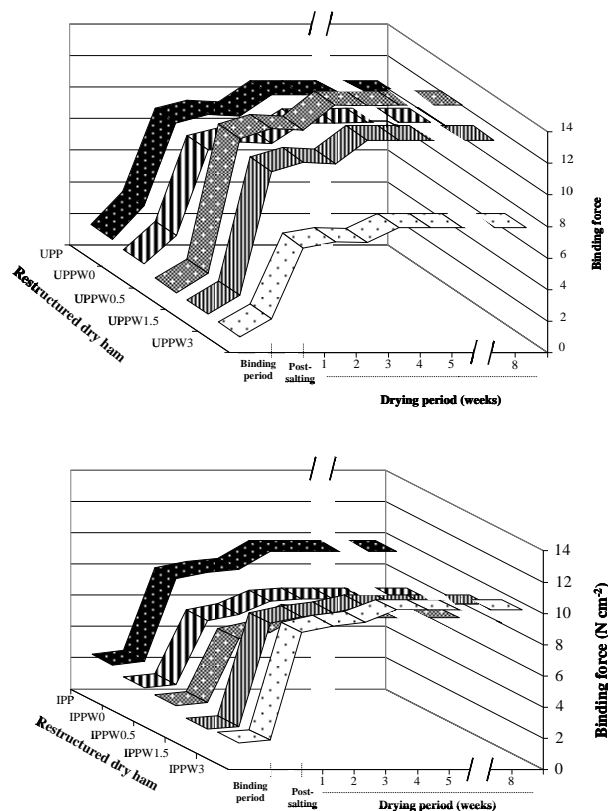
formation of the gel or clot three-dimensional network.

Further research on meat model systems was carried out to determine the viability of meat batters (with and without NaCl) with added plasma powder (ME0PPW0 and ME2PPW0, Table 1) as cold-set binding agents. These mixtures were applied onto meat surfaces pre-treated by U and I procedures (Table 3). The binding parameters ( $k$  and  $BF_{\max}$ ) showed low values, similar to those obtained for SS systems (Table 3). In a previous paper (Herrero et al., 2009b) it was reported that plasma powder in a meat emulsion forms a matrix with high stability and mechanical resistance, thus increasing the hardness, springiness and breaking force values of the meat system.

### 3.2. Experiments with fresh deboned legs

The viability of using plasma powder to restructure fresh deboned pork leg was evaluated in order to ultimately produce deboned dry-cured ham. For this purpose, 85 meat pieces obtained from fresh deboned leg were processed using the different meat pre-treatments, procedures of plasma powder preparation and mixture of meat batter [(5 x 3 meat pre-treatment x 5 plasma powder preparation) + (5 x 2 mixture of meat batter and plasma powder)] (Table 1). The restructured deboned legs (RDL) showed similar  $BF_{\max}$  values to those obtained with the meat model systems manufactured in analogous conditions and a binding time of 12 hours at  $4^\circ\text{C}$  was enough to achieve the  $BF_{\max}$ . Then, the RDL were salted and dried following a commercial process (Santos et al., 2008). The changes in the binding force ( $BF$ ) after salting and throughout the drying time are shown in Figure 2 and Table 3. In general, the salting of the RDL (PSRDL) with an untreated meat surface (U) resulted in an increase in the  $BF$  (Figure 2 and Table 3). However, if their meat surfaces were treated by procedure I, significant differences were not observed ( $p > 0.05$ ) between RDL (prior salting) and PSRDL (after salting) (Figure 2, Table 3). The RDL for which the meat surfaces were pre-treated by the SS procedure (Table 1) showed the lowest  $BF$ , both during pre-salting and post-salting, (Fig. 2 and Table 3). These RDL were discarded because the  $BF$  decreased during the first week of drying and multiples voids appeared throughout the binding area (Table 3). These results can be related to previous findings (Brøndum, Byrne, Bak, Bertelsen, & Engelsen, 2000; Whiting, 1987; Whiting, 1988; Herrero et al., 2009a, b; Chen, Xu, & Wang, 2007) concerning the effect of NaCl addition to meat systems. Chen et al. (2007) studied the thermal transition temperature of meat with and without

NaCl (2.5%) and reported that salt addition caused a destabilizing effect on the meat protein. Moreover, Raman spectroscopy analyses have revealed an increase in the hydrophobic interactions between protein chains when salt is added to the meat batter systems (Herrero et al., 2009b). Consequently, when salt was added, there would have been less myofibrillar protein chains to be bound with the plasma powder components. Therefore, there must have been a three-dimensional network limitation which restricted the formation of a gel matrix.



**Fig. 2.** Binding force ( $\text{N cm}^{-2}$ ) evolution during the binding, salting and drying periods of restructured dry ham using plasma powder as cold-set binding agent.

UPP, UPPW0, UPPW0.5, UPPW1.5, UPPW3, IPP, IPPW0, IPPW0.5, IPPW1.5, IPPW3: pre-treatments of the meat surface and plasma powder preparation conditions as indicate in Table 1.

These findings differ to those obtained with other cold-set bindings such as microbial transglutaminase (MTGase). In the latter case, stable cross-links were obtained between meat surfaces that were pre-treated with evenly distributed salts (Romero de Ávila et al., 2010). The diverging behaviours reflect the different manners in which MTGase and plasma protein act, when used as cold-set binding agents. The transglutaminase (TGase) catalyzes the cross-linking between protein molecules (Yokoyama, Nio, & Kikuchi, 2004) by an acyl transfer reaction between the  $\gamma$ -carboxamide group of a peptide-bound

glutaminy residue (acyl donor) and a variety of primary amines (acyl receptors). The plasma protein concentrate contains a complex mix of proteins, including fibrinogen and blood plasma enzymes (Roodink, & Zuidweg, 2003). The addition of this plasma protein concentrate to meat systems changes the protein structure by increasing hydrophobic interactions (Herrero et al., 2009b).

In the PSRDL obtained by U and I pre-treatments, there was an increase in the  $BF$  over the drying periods (Fig.2). In general, these restructured pieces showed similar ( $p > 0.05$ ) binding forces and binding rates (Table 3). The  $BF_{max}$  was reached between the second and third week of drying, and had binding rates in the range of  $0.01$  to  $0.03 \text{ Ncm}^{-2}\text{h}^{-1}$ . After the 3<sup>rd</sup> week, the binding forces were not significantly affected ( $p > 0.05$ ) by the drying time and were maintained in the range of  $7$ – $13 \text{ Ncm}^{-2}$ . The binding forces reached by the restructured deboned dry ham (RDDH type U and I) were similar to the breaking forces shown by some dry fermented sausages (Herrero et al., 2007) and higher than those reported for cooked meat sausages (Herrero, de la Hoz, Ordóñez, Herranz, Romero de Ávila, & Cambero, 2008), which implies good resistance to the handling and manufacturing process, including slicing. The results obtained suggest that it is possible to restructure deboned leg when plasma protein as a powder or rehydrated in water or in a NaCl aqueous solution (in different concentrations) is applied onto untreated meat surfaces or immersed in an aqueous salt solution since it provides a stable union between meat surfaces, which increases in the course of the salting and drying periods. In contrast to what happens with other cold-set binding agents, such as transglutaminase (Kuraishi et al., 1997, Romero de Ávila, 2010), the presence of NaCl is not necessary to obtain a well restructured product. Nonetheless, to control the possible growth of spoilage microorganisms, the application of a mixture of salts (NaCl with about 200 ppm of  $\text{KNO}_3$  and 100 ppm of  $\text{NaNO}_2$ ) in aqueous solution on the meat surfaces to be bound is recommended in the pre-treatment phase (I pre-treatment). Several authors (Martín, Benito, Hernández, Pérez-Nevado, Córdoba, & Córdoba, 2008; Paarup, Nieto, Peláez, & Reguera, 1999) reported that the mixture of salts may limit the microbial growth associated with ham spoilage. The antibacterial action of nitrate and nitrite is well-known and they are usually added as potassium or sodium salts to process meat products (Honikel, 2008). Paarup et al., (1999) reported that the counts of *Enterobacteriaceae* involved in the spoilage of dry-cured hams were negatively affected by high NaCl concentrations. When comparing the use of the two forms of plasma protein, the powder or rehydrated form, the latter one is recommendable because this



procedure allows an easier and more homogeneous distribution of the binding agent, and requires a smaller amount of the plasma protein product (about 27%).

Depending on the meat surface pre-treatment, the restructured deboned legs of type U and I showed similar behaviours in relation to the physico-chemical features. The pH values of PSRDL were about  $5.60 \pm 0.30$ . During the drying period (1<sup>st</sup> to 8<sup>th</sup> week), the pH values were about  $5.75 \pm 0.07$ . Obviously, during the salting and drying period, both types (U and I) showed a significant ( $p < 0.05$ ) decrease in water content and  $a_w$ , which went from  $76.52 \pm 1.14\%$  and  $0.981 \pm 0.003$ , respectively, in fresh meat, to  $70.22 \pm 3.78\%$  and  $0.933 \pm 0.014$  after salting, and  $52.41 \pm 2.49\%$  and  $0.894 \pm 0.009$  at 2 weeks of drying. Afterwards, the values were maintained and reached  $50.61 \pm 3.57\%$  and  $0.874 \pm 0.027$  at 6-8 weeks of drying. The ash content (% product) showed an increase ( $p < 0.05$ ), with values of  $1.09 \pm 0.13\%$  in fresh meat,  $4.2 \pm 2.1\%$  after salting (about 6 g NaCl on defatted dry matter),  $8.7 \pm 2.7\%$  at 2 weeks of drying (about 12g NaCl on defatted dry matter) and  $10.1 \pm 3.1\%$  at 8 weeks of drying, associated with a salt content of around 14 g NaCl on defatted dry matter. This salt content was close to the maximum amounts allowed (under 15% of defatted dry matter) in the specifications of Serrano dry-cured ham (EC, 1999). Therefore, the increase in the  $BF$  was parallel to both the decrease in water content and the increase in salt content in both RDL U and I type. The  $BF_{max}$  was obtained once the meat pieces had lost the maximum amount of water (2-3 weeks of drying) with an  $a_w$  below 0.9. The increase in the  $BF$  between meat surfaces probably depends on the state of the proteins during the dry processing period. Several authors (Virgili, Parolari, Schivazappa, Soresi-Bordini, & Borri, 1995) found a positive correlation between hardness and salt concentration in several types of dry-cured hams. It is assumed that hardness and chewiness increase during the initial steps of processing due to a decrease in the protein solubility and water content (Monin et al., 1997). Our results could indicate that plasma protein induces interactions or bonds between the meat surface proteins, which stabilizes the network during the salting and drying process in the restructured dry ham manufacture.

When mixtures of the meat batter (without and with NaCl) and plasma powder were used (MEPPW0 and ME2PPW0, Table 1) as cold-set binding agents, stable bonds were also obtained between meat surfaces. Similar results were obtained by applying these bonding agents onto meat surfaces pre-treated by procedures U and I (Table 3). The interactions induced by MEPPW0 and ME2PPW0 increased during drying of the RBL, although the  $BF$  was lower than

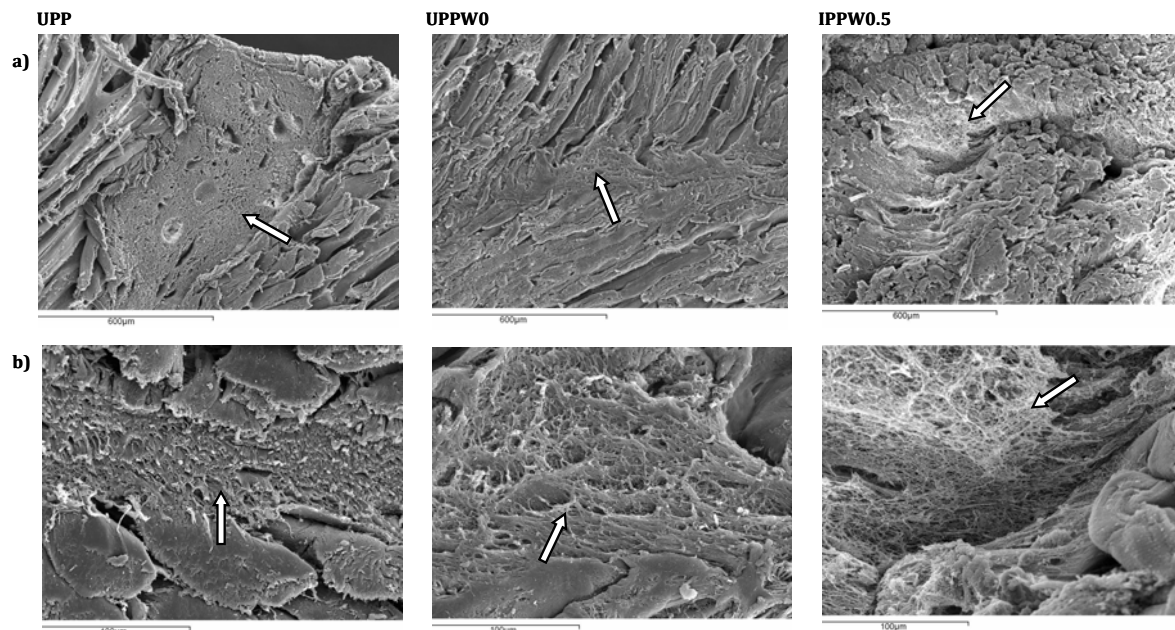
that achieved in the restructured RBL, using plasma powder without meat batter (Table 3). Because of the viscosity of the MEPPW0 and ME2PPW0 mixtures, a thick layer had to be spread onto the meat surfaces, which resulted in a wider binding area when only plasma was used, either in the powder or in the rehydrated form. The thickness of the binding area between the meat surfaces was probably responsible for the decreased  $BF$ . Although,  $BF$  in the ME0PPW0 and ME2PPW0 mixtures decreased, the bonds between the meat surfaces were stable during the salting and drying period; thus, these mixtures may be used to fill cavities when restructuring large deboned meat pieces. Moreover, the restructured deboned legs manufactured following these procedures (UMEPPW0, UME2PPW0, IMEPPW0 and IME2PPW0) withstood the handling and production processes, and even allowed slicing.

### 3.3. Microstructure of the restructured dry ham binding area

The images obtained by scanning electron microscopy (SEM) of the binding area of the pork model systems suggest a cold-set gelation process of the plasma protein with different degrees of connection in the meat surface. The differences between micrographs mainly depended on whether the plasma was in powder or rehydrated form. The plasma powder samples rehydrated with water (PPW0) and with different concentrations of NaCl in the aqueous solution (PPW0.5, PPW1.5 and PPW3) showed similar microstructures. For this reason, by way of an example, only samples from the UPP, UPPW0 and IPPW0.5 pork model systems are shown (Figure 3). When the plasma was used as a powder (Figure 3, UPP), a clear binding line between the meat surfaces was observed because the plasma protein formed a homogeneous and regular microstructure between the muscle fibres. However, when the plasma was rehydrated (Fig. 3 UPPW0 and IPPW0.5), it spread between the meat surface structures thus a clear binding line was not observed. In this case, the plasma proteins create a mesh-like structure which interweaves with the muscle fibres. When the binding agent was applied to the meat pre-treated by procedure I, the resulting structure was less compact, and a three-dimensional network structure was observed with interconnections with the muscle fibres (Fig. 3 IPPW0.5). This behaviour is probably due to the fact that in the meat treated by procedure I, there is more free water available which facilitates the solubility of the plasma protein that could contribute towards establishing this mesh-like structure. However, in the untreated meat surface (U), there was a dense and continuous protein network structure, which was much more compact

and heterogenous (Fig. 3 UPPW0). This microstructure probably occurs because there is a tacky substance between the untreated meat

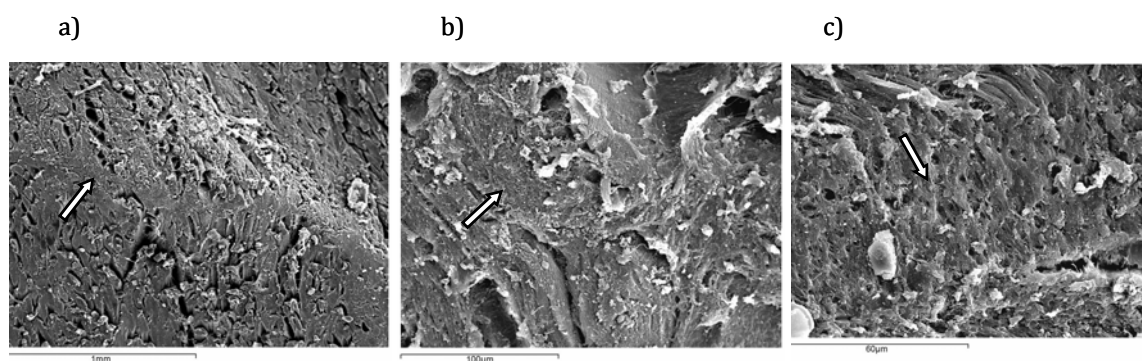
surfaces, which prevents the binding agent from spreading easily between the muscle fibres.



**Fig. 3.** Scanning electron micrographs using secondary electrons, at 100 (a) and 500 (b) magnifications, of binding area in restructured meat model systems elaborated according to UPP, UPPW0 and IPPW0.5, as indicated in Table 1.

The different behaviours of the restructured meat systems UPP, UPPW0 and IPPW0.5 could indicate changes in the secondary and tertiary structure of the plasma protein when water is added with and without NaCl. In a previous work, using Raman spectroscopy the plasma powder presented a lower  $\alpha$ -helix content than rehydrated plasma. Plasma powder rehydration was also accompanied by a decrease in the  $\beta$ -sheet and an unordered structure (Herrero et al., 2009b). Likewise, the microstructure of the binding area in the restructured meat model systems (Fig.3) could be related to the binding effect of the plasma protein addition to meat batter, detected when magnetic resonance imaging was used (MRI) (Herrero et al., 2009a). The MRI parameters obtained in this work indicate that the water rehydrated plasma powder probably formed a matrix composed of large spaces and bulk water. However, when the plasma powder is rehydrated with a saline solution, the resulting matrix presents smaller pores and less bulk water. This result is probably a consequence of the abundant presence of aliphatic residue exposures upon addition of NaCl to plasma proteins (Herrero et al., 2009b). These protein structural changes may produce modifications in protein-water and protein-protein interactions.

In all the experimental procedures used to restructure the fresh deboned leg, drying produced a retraction of the binding area, thus resulting in a less visible binding structure. For example, Fig. 4 shows the images obtained by Scanning Electron Microscopy (SEM) of the binding area of IPPW0.5 restructured dry deboned ham (IPPW0.5 RDDH) at 8 weeks. As can be seen at x60 magnifications, the binding area is barely visible. When the micrographs from the IPPW0.5 pork model system (Fig. 3) and those from IPPW0.5 RDDH after 8 weeks of drying time (Fig. 4) are compared, the binding zone of the RDDH showed a structured matrix that was more compact and homogeneous with more thick strand interconnections (Fig. 4 c). This may explain why the *BF* increased (Table 3) over the drying time. These results may be due to an increase in covalent cross-links favoured by the increased concentration of protein substrate associated with the modifications occurring during the drying period, i.e., a decrease in the protein solubility and water content (Monin et al., 1997). The results obtained by applying MRI to study the effect of the addition of fibrinogen and thrombin to meat systems suggest that a stable three-dimensional network has developed (Herrero et al., 2009a). The same phenomenon probably occurred in the present work when using plasma powder.



**Fig. 4.** Scanning electron micrographs using secondary electrons, at 60 (a), 500 (b) and 1000 (c) magnifications, of binding area in restructured deboned ham elaborated according to IPPW0.5, as indicated in Table 1.

#### 4. Conclusions

Plasma powder can be used to bind fresh pork surfaces. Bearing in mind the binding parameters [binding rate ( $\text{Ncm}^{-2}\text{h}^{-1}$ ) and maximum binding force ( $\text{Ncm}^{-2}$ )], the most appropriate procedure to restructure fresh pork would be by applying plasma proteins, as a powder or rehydrated in water or in a NaCl aqueous solution at 0.5 % (w/v), onto meat surfaces pre-treated by immersion in a saline solution. The plasma powder can also be applied onto untreated meat surfaces thus attaining a high binding force.

Similar procedures may be used to restructure fresh deboned leg, which can be salted and dried following an analogous process to that of the commercial manufacture of dry ham, since plasma powder provides enough stable cross-links. During the drying period, there was an increase in the binding force with a concomitant decrease in water content and an increase in the salt content. The high binding force detected in fresh pork model systems and in restructured deboned hams reflects the potential of the plasma powder as a cold gelifying and cold-set binding agent.

#### Acknowledgements

The authors are grateful for the financial support of projects AGL04-6773, AGL2010-19158 and CARNISENUSA (CSD2007-00016), included in the CONSOLIDER-INGENIO 2010 issue (Ministerio de Educación y Ciencia). SEM facilities were provided by the CAI de Microscopía Electrónica "Luis Bru" of the UCM by Eugenio Baldonado.

#### References

- Álvarez de la Puente, J. (2003). International trade of cured ham: promotion and barriers. *II World Congress of Dry Cured Ham*. International Commerce Plenary Session conferences. Cáceres, Spain.
- AOAC (1995). *Official methods of analysis* (16<sup>th</sup> ed.). Association of Official Analytical Chemists.
- Brøndum, J., Byrne, D. V., Bak, L. S., Bertelsen, G., & Engelsen, S. B. (2000). Warmedover flavour in porcine meat-a combined spectroscopic, sensory and chemometric study. *Meat Science*, *54*, 83-95.
- Cambero, M. I., López, M. O., de la Hoz, L., & Ordoñez, J. A. (1991). Restructured meat. Composition and binding-properties. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, *31*, 293-309.
- Causton, D. R., & Venus, J. C. (1981). *The biometry of plant growth*. London: Edward Arnold Ltd.
- Chen, H. H., Xu, S. Y., & Wang, Z. (2007). Interaction between flaxseed gum and meat protein. *Journal of Food Engineering*, *80*, 1051-1059.
- Chou D.H., & Morr C.V. (1979). Protein-water interactions and functional properties. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *56*, 53-56.
- Elizalde, I. (2008). El jamón español se prepara para hablar mandarín. *Expansión, Edición impresa*. March 25.
- European Commission (EC). (1999). Commission Regulation (EC) No. 2419/1999 of 12 November 1999 supplementing the Annex to Regulation (EC) No. 2301/97 on the entry of certain names in the Register of certificates of specific character provided for in Council Regulation (EEC) No. 2082/92 on certificates of specific character for agricultural products and foodstuffs. *Official Journal of the European Communities*, of 13.11.1999, L291, 25-26.
- European Food Safety Authority (EFSA). (2005). Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to the use of an enzyme preparation based on thrombin:fibrinogen derived from cattle and/or pigs as a food additive for reconstituting food. *The EFSA Journal*, (2005), 214, p. 1.
- European Parliament and the Council of the European Union. (2004a). Regulation (EC) No. 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific rules for on the hygiene of foodstuffs. *Official Journal of the European Union* of 30.4.2004, L139/55-L139/256.
- European Parliament and the Council of the European Union. (2004b). Regulation (EC) No. 854/2004 of the European

- Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific rules for the organisation of official controls on products of animal origin intended for human consumption. *Official Journal of the European Union* of 25.6.2004, L226/83-L226/94
- European Parliament and the Council of the European Union. (2008). Regulation (EC) No. 1333/2008 of the European parliament and of the Council of 16 December 2008 on food additives. *Official Journal of the European Union* of 31.12.2008, L354/16-L354/33.
- European Parliament. (2010). Food additives other than colours and sweeteners. P7\_TA(2010)0182. European Parliament resolution of 19 May 2010 on the draft Commission directive amending the Annexes to European Parliament and Council Directive 95/2/EC on food additives other than colours and sweeteners and repealing Decision 2004/374/EC. *Official Journal of the European Union* of 31.5.2011, C161 E/63-C161 E/65.
- Fennema O. R. (1993). *Food chemistry*. (2<sup>nd</sup> ed.). New York: Marcel Dekker Inc.
- Gentry, P. A. (2004). Comparative aspects of blood coagulation. *The Veterinary Journal*, 168, 238-251.
- Hamm, R. (1960). Biochemistry of meat hydration. *Advances in Food Research*, 10, 355.
- Herrero, A. M., Ordóñez, J. A., Romero de Ávila, M. D., Herranz, B., de la Hoz, L., & Cambero, M. I. (2007). Breaking strength of dry fermented sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) and physico-chemical characteristics. *Meat Science*, 77, 331-338.
- Herrero, A. M., de la Hoz, L., Ordóñez, J. A., Herranz, B., Romero de Ávila, M. D., & Cambero, M. I. (2008). Tensile properties of cooked meat sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) parameters and physicochemical characteristics. *Meat Science*, 80, 690-696.
- Herrero, A. M., De La Hoz, L., Ordóñez, J. A., Castejón, D., Romero de Ávila, M. D., & Cambero, M. I. (2009a). Magnetic resonance imaging study of the cold-set gelation of meat systems containing plasma powder. *Food Research International*, 42, 1362-1372.
- Herrero, A. M., Cambero, M. I., Ordóñez, J. A., De la Hoz, L., & Carmona, P. (2009b). Plasma powder as cold-set binding agent for meat system: Rheological and Raman spectroscopy study. *Food Chemistry*, 113, 493-499.
- Honikel, K. O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science*, 78, 68-76.
- Jantawat, P., Chinprahast, N., & Kristavee, D. (1996). Functional property of stored dried porcine plasma powders and its effect on sausage quality. *ASEAN Food Journal*, 11, (2), 69-73.
- Kauffman, R. G., Eikelenboom, G., van der Wal, P. G., Merkus, G., & Zaar, M. (1986). The use of filter paper to estimate drip loss of porcine musculature. *Meat Science*, 18, 191-198.
- Kuraishi, C., Sakamoto, J., Yamazaki, K., Susa, Y., Kuhara, C., & Soeda, T. (1997). Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking. *Journal of Food Science*, 62, 488-490, 515.
- Machado, F. F., Coimbra, J. S. R., Garcia Rojas, E. E., Minim, L. A., Oliveira, F. C., & Sousa, R. C. S. (2007). Solubility and density of egg white proteins: Effect of pH and saline concentration. *LWT-Food Science and Technology*, 40, (7), 1304-1307.
- Mandigo, R. W. (1988). Restructured meats. In R. Lawrie (Ed.). *Developments in meat science*, (pp. 297-315). New York: Elsevier (4).
- Martín-Bejarano, S. (2001). Elaboración del jamón curado de cerdo blanco. In S. Martín-Bejarano (Ed.). *Enciclopedia de la carne y de los productos cárnicos*, Vol. 2, (pp. 1205-1219). Plasencia: Martín & Macías.
- Martín, A., Benito, M. J., Hernández, A., Pérez-Nevado, F., Córdoba, J. J., & Córdoba, M. G. (2008). Characterisation of microbial deep spoilage in Iberian dry-cured ham. *Meat Science*, 78, 475-484.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2007). Real Decreto 1469/2007, de 2 de noviembre, por el que se aprueba la norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo ibéricos. *Boletín Oficial del Estado* de 3.11.2007, 264, 45087-45104.
- Monin, G., Marinova, P., Talmant, A., Martín, J. F., Cornet, M., Lanore, D., & Grasso, F. (1997). Chemical and structural changes in dry-cured hams (Bayonne hams) during processing and effects of the dehairing technique. *Meat Science*, 42, 29-47.
- Ockerman, H. W., Basu, L., León Crespo, F., & Céspedes, J. (2002). Comparison of European and American systems of production and consumption of dry-cured hams. *American Meat Science Association*, (pp. 1-12). Des Moines: National Pork Board.
- Ofori, J. A., & Hsieh, Y. P. (2012). The use of blood and derived products as food additives. In Yehia El-Samragy (Ed.), *Food Additive* (pp. 229-256). Available from: <http://www.intechopen.com/articles/show/title/the-use-of-blood-and-derived-products-as-food-additives>. InTech
- Othner, C.L. & Kosow, D.P. (1980). Evidence that human  $\alpha$ -thrombin is a monovalent cation activated enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 202, 63-75.
- Paardekooper, E. J. C., & Wijngaards, G. (1988). Composite meat product and method for the manufacture thereof. *International Patent No. 8501333*. Netherlands, issued May 3.
- Paarup, T., Nieto, J. C., Peláez, C., & Reguera, J. I. (1999). Microbiological and physicochemical characterisation of deep spoilage in Spanish dry-cured hams and characterisation of isolated Enterobacteriaceae with regard to salt and temperature tolerance. *European Food Research and Technology*, 209, 366-371.
- Papi, M., Arcovito, G., De Spirito, M., Amiconi, G., Bellelli, A., & Boumis, G. (2005). Simultaneous static and dynamic light scattering approach to the characterization of the different fibrin gel structures occurring by changing chloride concentration. *Applied Physics Letters*, 86, 183901-183903.
- Richard, F. J. (1959). A flexible growth function for empirical use. *Journal of Experimental Botany*, 10, 290-300.
- Romero de Ávila, M. D., Ordóñez, J. A., De la Hoz, L., Herrero, A. M., & Cambero, M. I. (2010). Microbial transglutaminase for cold-set binding of unsalted/salted pork models and restructured dry ham. *Meat Science*, 84, 747-754.
- Roodink, H. B. J., & Zuidweg, P. (2003). Preparation of blood plasma powder for bonding together pieces of foodstuff, e.g. meat, involves preparing fibrinogen concentrate from blood plasma, and spray-drying fibrinogen concentrate to form powder. *Patent Number(s): WO2003063607-A; WO2003063607-A1; NL1019873C2; AU2003203315-A1; EP1469740-A1; US2005170068-A1*.
- Ryan, E. A., Mockros, L. F., Weisel, J. W., & Lorand, L. (1999). Structural origin of fibrin clot rheology. *Biophysical Journal*, 77, 2813-2826.
- Santos, C., Hoz, L., Cambero, I., Cabeza, C., & Ordóñez, J. A. (2008). Enrichment of dry cured ham with  $\alpha$ -linolenic acid and  $\alpha$ -tocopherol by the use of linseed oil and  $\alpha$ -tocopheryl acetate in pig diets. *Meat Science*, 80, 668-674.
- Standeven, K. F., Ariens, R. A. S., Grant, P. J. (2005). The molecular physiology and pathology of fibrin structure/function. *Blood Reviews*, 19, 275-288.
- Tarté, R. (2009). Meat-Derived Protein Ingredients. In R. Tarté (Ed.). *Ingredients in meat products: Properties, Functionality and Applications* (pp 145-171). New York: Springer.
- United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (USDA/FSIS). (1995). Labeling and Consumer Protection. Questions and answers relating to use and labelling of ingredients, including flavorings, proprietary ingredient mixes, ingredients in standardized and non-standardized foods, and protein hydrolysates. Retrieved January 13, 2008, from: [http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/larc/Ingredients/PMC\\_QA.htm](http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/larc/Ingredients/PMC_QA.htm)
- United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (USDA/FSIS). (2005). Food Standards and labelling policy book. Retrieved October 20, 2007, from: [http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/larc/Policies/Labeling\\_Policy\\_Book\\_082005.pdf](http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/larc/Policies/Labeling_Policy_Book_082005.pdf)

- Ventanas, J., Ruiz, J., & Córdoba, J. J. (2001). El jamón curado de cerdo ibérico: descripción del proceso tradicional de elaboración. In S. Martín-Bejarano (Ed.). *Enciclopedia de la carne y de los productos cárnicos, Vol. 2*, (pp. 1221-1245). Plasencia: Martín & Macías.
- Vindigni, A., & Di Cera, E. (1996). Release of fibrinopeptides by the slow and fast forms of thrombin. *Biochemistry*, 35, 4417-26.
- Virgili, R., Parolari, G., Schivazappa, C., Soresi-Bordini, C., & Borri, M. (1995). Sensory and texture quality of dry-cured ham as affected by endogenous cathepsin B activity and muscle composition. *Journal of Food Science*, 60, 1183-1186.
- Weisel, J. W. (2004). The mechanical properties of fibrin for basic scientists and clinicians. *Biophysical Chemistry*, 112, 267-276.
- Weisel, J. W. (2005). Fibrinogen and fibrin. *Advances in Protein Chemistry*, 70, 247- 256.
- Whiting, R. C. (1987). Influence of various salts and water soluble compounds on water and fat exudation and gel strength of meat batters. *Journal of Food Science*, 52, 1130-1132, 1158.
- Whiting, R. C. (1988). Solute-protein interactions in a meat batter. *Reciprocal Meat Conference Proceeding*, 41, 53-56.
- Wijngaards, G., & Paardekooper, E. J. C. (1988). Preparation of a composite by means of an enzymatically formed protein gel. In B. Krol, P. S. van Roon, & J. H. Houben (Eds.). *Trends in Modern Meat Technology*, (2<sup>nd</sup>ed.), (pp. 125-130). Wageningen:Pudoc.
- Yokoyama, K., Nio, N., & Kikuchi, Y. (2004). Properties and applications of microbial transglutaminase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 447-454.

### **ARTÍCULO 3.3.**

**Dry-cured ham restructured with fibrin**

**Food Chemistry. (2013). En revisión.**



Ms. Ref. No.: FOODCHEM-D-13-03904

Title: Dry-cured ham restructured with fibrin

Food Chemistry

Dear Isabel,

Your submission entitled "**Dry-cured ham restructured with fibrin**" has been assigned the following manuscript number: FOODCHEM-D-13-03904.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/foodchem/>.

Your username is: icambero

If you need to retrieve password details, please go to: [http://ees.elsevier.com/foodchem/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/foodchem/automail_query.asp)

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Food Chemistry





# Dry-cured ham restructured with fibrin

M. Dolores Romero de Ávila, Lorenzo de la Hoz, Juan A. Ordóñez, M. Isabel Cambero\*

Dpto. de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense. 28040 Madrid. Spain

## ABSTRACT

The viability of fibrinogen-thrombin system (FT) to bind fresh deboned legs for incorporation in the salting and ripening processes, to produce cured ham, was studied. The effects of the different processing variables (pH, NaCl concentration, temperature and gelification time) on FT, meat emulsion mixed with FT, fresh pork portions and deboned hams restructured with FT were analyzed. The most stable and resistant fibrin gels were obtained after 6 h of adding the FT, with less than 2 % NaCl and pH 7-8.4.

Scanning electron microscopy of the fibrin gel showed fibrillar structures with a high degree of cross-linking and a high density. Two structures were found in the binding area of restructured meat; one in the central part of similar characteristics to fibrin gels and, another in the area of contact between the meat surfaces, in which a filamentous structure connecting the fibrin gels with the muscle bundles.

**Keywords:** fibrinogen-thrombin; pork; cold-set binder; binding parameters; restructured dry ham; microstructure.

## 1. Introduction

Traditionally, ripened ham has been commercialized as a whole piece whereas today the most successful products are the ready-to-eat formats, and there has been a clear expansion of the market (about 73% for exports) for deboned dry-cured ham, either whole or as portions (200 – 500 g) or slices (Elizalde, 2008). The manufacture of dry-cured ham from fresh deboned leg offers advantages during the production, storage and transport because it decreases the piece weight and volume in a quantity equivalent to the size of the bone. Deboned hams are also the most suitable for cutting and slicing. There are, therefore numerous reasons for developing a procedure with which to manufacture dry-cured ham using deboned fresh pork legs.

For some time the meat industry has been using a range of cold-set binding systems (alginates, blood plasma factors and enzyme complexes) to make restructured products from smaller pieces of fresh meat and to improve the stability, texture and consistency of meat and fish gels, in all cases with great success (Vigneron, 1988, Dimitrakopoulou,

Ambrosiadis, Zetou, & Bloukas, 2005; Cambero, López, de la Hoz, & Ordóñez, 1991). These agents can be considered as new types of additives or coadjuvants, "binding agents", in food production and share the ability to interact stably with meat components. Different blood plasma preparations can be used as binding agents (Tsai, Tseng, Yang, & Chen, 2006; Herrero, Cambero, Ordóñez, Castejón, Romero de Ávila, & de la Hoz, 2007; Herrero, Cambero, Ordóñez, de la Hoz, & Carmona, 2009). Most of them owe their cohesive effect to the formation of fibrin from fibrinogen in the presence of thrombin. Fibrinogen is an elongated protein and is made up of globular domains at each end connected by  $\alpha$ -helical coiled coils to a globular region in the middle (Standeven, Ariens, & Grant, 2005). Thrombin converts soluble fibrinogen to insoluble fibrin polymer by cleaving fibrin peptides from the central domain, exposing knobs that can then interact with holes that are always exposed at the ends of the molecule, giving rise to a half-staggered structure called the protofibril. When the protofibrils grow long enough they aggregate laterally to form fibers, which then branch to yield the three-dimensional network of the fibrin clot or stable fibrin gel (Gentry, 2004). The fibrin complex is stable, both to heat treatment and freezing, and can interact with

\* Author to whom the correspondence should be addressed: M. I. Cambero. Departamento Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense. 28040 Madrid. Spain. Phone: +34 913943745; Fax: +34 913943743 E-mail: [icambero@vet.ucm.es](mailto:icambero@vet.ucm.es) (M.I. Cambero)

myofibrillar proteins and with collagen (Paardekooper & Wijngaards, 1988). Results of a range of experiments in this field suggest that these systems could be used to eliminate the cavities produced by the deboning of meat portions. The work described here is part of this same line of research. The final objective of this study is to restructure fresh deboned pork legs using fibrinogen-thrombin system as cold-set binding agent, in order to be seasoned and ripened in a similar process to that used in the production of cured hams.

## 2. Materials and methods

Fibrinogen (5.0 mg/mL) and thrombin (20 NIH/mL) solutions, from porcine blood plasma combined commercially as Fibrimex™, were obtained from Sonac B.V. (Loenen, Netherlands). Before use, independent fibrinogen (F) and thrombin (T) were thawed in plastic containers immersed in agitated water at 25 °C for 60 min. For each experiment with fibrinogen and thrombin, 10 parts of fibrinogen were mixed with 1 part of thrombin (FT, 10/1, v/v) and shaken for 30 s.

Fresh pork from deboned whole leg was purchased from a local abattoir at 48 h post-mortem. To achieve homogeneous samples, only meat from female white pigs (Landrace x Large White) fed in confinement with a commercial diet was acquired. Animals were stunned, slaughtered and exsanguinated at a local slaughterhouse at 100.3 ± 8.01 kg live-weight (about 6 months of age).

### 2.1. Experimental layout

The following four different types of model systems were considered,

#### 2.1.1. Fibrinogen-thrombin (FT) mixtures

Different FT mixtures were prepared to study the following process conditions (Table 1):

a) pH of the FT mixtures. First the pH of the fibrinogen was adjusted to values between 5 and 8 (using 0.5 M HCl) and then thrombin was added.

b) The concentration of NaCl in FT mixtures. A volume of 100 mL of fibrinogen was mixed with the corresponding amount of NaCl to obtain final concentrations in the FT mixture of 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 10, 20 % of NaCl (FT/NaCl, v/w) and then thrombin (10 mL) was added.

c) Gelification temperature. The FT mixtures were kept at 0, 6 and 10 °C.

d) Gelification time (0-48h). The FT mixtures were stored at the previously indicated temperatures for up to 48 h.

Each individual FT mixture was produced in triplicate.

**Table 1.** Elaboration procedures used for preparation of the model systems [fibrinogen-thrombin mixture (FT), meat emulsion added with FT, restructured pork] and to restructure fresh deboned legs

	Symbol
<b>1. Model systems</b>	
Fibrinogen (5.0 mg/mL) and thrombin (20 NIH/mL) mixtures (10 parts of fibrinogen solution was mixed with 1 part of thrombin, v/v)	FT
Meat emulsion* supplemented with FT	ME-FT
Restructure pork (pork model system)	PMS
<b>2. Restructured deboned leg</b>	RDL
Restructured deboned leg post-salting	RDL-PS
Dry restructured deboned leg	RDL-D
<b>3. Variables used</b>	
<b>3.1. Fibrinogen and thrombin mixtures (10/1, v/v)</b>	
pH adjusted to: 8, 7, 6, 5	
% NaCl: 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 10, 20 (FT/NaCl, v/w)	
<b>3.2. Addition of FT to meat emulsion</b>	
Meat emulsion (ME) were supplemented with 0, 10, 20, 30, 40, 50 % of FT to obtain ME-FT model systems (w/v)	
<b>3.3. Meat pre-treatment</b>	
Untrated	U
Immersed in aqueous solution of a mixture of salts (NaCl with 200 ppm of KNO <sub>3</sub> , and 100 ppm of NaNO <sub>2</sub> ) at 3% (w/v) for 10 min	I
Even distribution of (1 min) a mixture of salts (NaCl with 200 ppm of KNO <sub>3</sub> , and 100 ppm of NaNO <sub>2</sub> ) on the surfaces, setting time 10 min, and washed with aqueous solution of the mixture of salts at 3% (w/v).	SS
<b>3.4. Packing</b>	
Atmospheric pressure in plastic containers	A
Vacuum packing at 20 kPa in plastic bags	V
Vacuum packing at 20 kPa in plastic bags with meat product covered with the mixture of salts (simultaneous binding and salting procedure)	VS
<b>3.5. Gelification temperature</b>	
0 °C	
6 °C	
10 °C	
<b>3.6. Gelification time</b>	
Between 0 and 48 h	
The breaking strength of the FT and ME-FT were determined at intervals of 30 minutes during a period of six hours, then every hour for the next eighteen hours (between 6 and 24 h) and then every four hours afterwards (between 24 and 48 h).	
<b>3.7. Binding time</b>	
The binding force of the PMS were determined at intervals of 30 minutes during a period of six hours and then every hour afterwards (between 6 and 24 h).	
The binding force of RDL were determined at the end of the binding period, immediately after salt removal from the meat surface (RDL-PS) and every seven days during the drying period (RDL-D) (10 weeks).	

\* Meat batter with water or NaCl aqueous solution (100 parts of pork and 11 parts of water or NaCl aqueous solution, w/w). The NaCl aqueous solutions were elaborated to obtain a concentration of 0.25, 0.5 and 2% of NaCl in the final mixture ME-FT. pH was adjusted to 7.4

#### 2.1.2. Meat emulsion supplemented with FT mixture (ME-FT model system)

Mixtures of meat emulsion were supplemented with different amounts of FT mixtures [0, 10, 20, 30, 40 and 50 % of FT in the final ME-FT mixture, (w/v)]. The conditions employed for preparing the FT mixtures were those selected after the experimental procedure described in section 2.1.1 (Table 1).

To make the meat emulsion (ME), the fat and connective tissue were removed from the fresh pork (biceps femoris muscle). Then, meat was added to a cutter (Robot Coupe R 8 V.V., Vincennes Cedex, France), where the material was cut and, after that, mixed with water or NaCl aqueous solution (100 parts of pork/11 water or aqueous solution, w/w) to obtain a homogeneous mixture. The process was performed by controlling the temperature to maintain the product at 0–2 °C.

The ME-FT models were gently prepared in a mixer by adding the ingredients in the following order: meat emulsion (meat and water or NaCl aqueous solution), F, and T (w/v/v). Fibrinogen and thrombin (10/1, v/v) were incorporated in the amounts required to obtain a known percentage of FT in the final mixture ME-FT (w/v). Different NaCl aqueous solutions were prepared to obtain concentrations of 0.25, 0.5 and 2% of NaCl in the final mixture ME-FT (w/w).

Each of the individual ME-FT models was carried out in triplicate (pork pieces from different animals being used in each case).

Each FT mixture (with or without NaCl), ME and ME-FT was extended (0.5 cm thick) in circular plastic containers (diameter = 9 cm). The binding temperatures were established after carrying out the procedure described in section 2.1.1.

#### 2.1.3. Pork model system (PMS)

The model systems (approximately 1 kg in weight) were made from two meat portions obtained from deboned legs of pork, which had internal surfaces, originally touching or close to the femur (quadriceps femoris, semimembranosus, biceps femoris). These were considered as the meat binding surfaces and the FT mixtures were applied to them. Previously, these meat surfaces were subjected to one of the followed pre-treatments (Table 1):

(U) Samples without additional treatment.

(I) Samples were immersed in a saline (NaCl with about 200 ppm of KNO<sub>3</sub> and 100 ppm of NaNO<sub>2</sub>) aqueous solution (3%, w/v) for 10 min at 4 °C, after which the excess fluid was removed with a filter

paper.

(SS) A mixture of salts (NaCl with 200 ppm of KNO<sub>3</sub> and 100 ppm of NaNO<sub>2</sub>) was evenly spread on the meat surface. After 10 min setting time, the surfaces were washed with the same saline aqueous solution (3 %, w/v) then the excess liquid was removed using a filter paper.

Meat surfaces with the same pre-treatment were covered with FT mixture (forming a continuous layer of approximately 2.5 mm) and were immediately placed in contact to obtain a meat-FT-meat structure (binding area). The FT mixture was prepared following the conditions selected by following the procedure described in sections 2.1.1 and 2.1.2.

The pork model systems were packed using two different procedures (Table 1):

(A) in plastic containers at atmospheric pressure.

(V) in plastic bags (Cryovac®) in a high-vacuum machine (750/400 model, Vapta, SL, Spain) until a vacuum of 20 kPa was reached.

Each of the individual PMS was elaborated in triplicate (a pork piece from a different animal was used in each case).

#### 2.1.4. Restructured fresh deboned legs (RDL)

The distal meat portions and external or hanging flaps were removed from the deboned pork legs to obtain homogeneous pieces of a similar cross-sectional area, obtaining deboned pork portions weighing about 3 kg. The uncovered muscle surfaces resulting from the deboning process were pre-treated by procedures U, I and SS (Table 1). To restructure the fresh deboned legs, the FT mixture (F/T, 10/1, v/v) was gently applied onto muscle surfaces uncovered during the deboning process. The pork legs were then restructured by placing parallel meat surfaces in contact and were immediately packed using one of three different procedures (A, V and vS). The pork deboned legs were packed as described in procedure A (plastic containers at atmospheric pressure) or V (in plastic bags in a high-vacuum machine) were stored at 6 °C during the binding time (Table 1). At the end of the binding period, the restructured deboned legs (RDL) were removed from the plastic bags and the pieces were covered with a dry mixture of salts (salting). The mixture of salts (NaCl with 200 ppm of KNO<sub>3</sub>, and 100 ppm of NaNO<sub>2</sub>) was similar to that used for dry-cured ham manufacture and the amount used was equivalent to 2% of the weight of the pork model complex (Santos, De la Hoz, Cambero, Cabeza, & Ordóñez, 2008). The salting period lasted 0.75 days per kg of restructured leg.

During the vS packing procedure, simultaneous binding and salting treatments were carried out (Table 1). These consisted in introducing the fresh deboned leg treated with FT mixture in plastic bags and covering with a dry mixture of salts (NaCl with 200 ppm of KNO<sub>3</sub>, and 100 ppm of NaNO<sub>2</sub>) and then vacuum-packing them (20 kPa). As in procedures A and V, the mixture of salts used was equivalent to 2% of the weight of meat (Santos et al., 2008). The fresh deboned legs treated with FT mixture and packed and salted were stored at 6 °C for a period of 0.75 day per kg of meat.

At the end of the salting period (about 2.25 days), and after removing the fresh deboned leg treated with FT mixture from the plastic bags in the case of the vS procedure, the excess salt was removed from the surfaces (post-salting restructured deboned legs, RDL-PS) and dried for up to 10 weeks at 10 °C and 80% relative humidity. The final product was named restructured deboned dry piece (RDL-D) (Table 1).

Five deboned legs were used for each restructured dry piece manufacturing process.

## **2.2. Rheological Analysis**

Texture profile analysis (TPA) and tensile test were carried out at about 22 °C, using a TA.XT2i SMS Stable Micro Systems Texture Analyser (Stable Microsystems Ltd., Surrey, U.K.) with the Texture Exponent programs.

TPA of the FT and ME-FT model systems was performed according to previous works (Herrero et al., 2007; Herrero, De la Hoz, Ordóñez, Herranz, Romero de Ávila, & Cambero, 2008). In general, this procedure involved the preparation of four cylinders of 1.5 cm height and 2 cm width from each sample. A double-compression cycle test was performed up to 50% compression of the original portion height with an aluminium cylinder probe P/25. The following parameters were quantified: hardness (N); springiness (m); adhesiveness (N s) and cohesiveness (Herrero et al., 2007, 2008).

Tensile test was used in the cases of the FT and ME-FT systems to determine the breaking strength (BS) or maximum force required for breaking the sample per cross-sectional area (N cm<sup>-2</sup>). A tensile test was also carried out to estimate the binding force (BF) or strength required (N cm<sup>-2</sup>) to separate the meat portions bound by cross-links (in PMS, RDL, RDL-PS and RDL-D) originated by FT mixture action.

Five rectangular slices (7 cm long, 2.5 cm wide and 0.5 cm thick) from each PMS and RDL (RDL-PS and RDL-D) were used to determine the BF at

different binding times (Table 1). The rectangular slices were obtained using an electric meat slicer machine (Slicers SP 300 CE DOM, Beckers, Italy) taking care to maintain the FT union on the transversal central line of the meat rectangle. For analysis, one tensile grip (A/TGT) was fixed onto the base of the textural analyzer, while the other one was attached to the load cell. The tensile test was performed according to previous works (Romero de Ávila, Ordóñez, de la Hoz, Herrero, & Cambero, 2010).

## **2.3. Scanning electronic microscopy analysis (SEM)**

The SEM analyses performed on the different model systems (FT, ME-FT, PMS and RDL) were carried out in the "ICTS Centro Nacional de Microscopía Electrónica". Samples were cut into cubes (0.5 cm side) which were fixed in a 4% glutaraldehyde buffered physiological solution for 4 hours at 4 °C. Then, samples were dehydrated by gradually increasing ethanol solutions from 30 % to 100 %, after which they were dried in liquid critical-point carbon dioxide, and subsequently coated with graphite and gold for analysis in a scanning electron microscope (JEOL, mod. JSM-6400, Japan) equipped with an Energy Dispersive X-ray (EDX) detector. Samples were kept in a desiccator until the time of visualization.

The samples were observed from x30 up to x10000 magnification. A minimum of five representative pictures at each magnification were taken for each sample at a voltage of 20 kV, using an Inca Oxford image capture system (Oxford Instruments Analytical Ltd., High Wycombe, UK).

## **2.4. Statistical Analysis**

An individual model system was the experimental unit for all data analysis. To check the normal distribution (90 % confidence) of samples, the Shapiro-Wilks test was applied. When samples fitted the normal distribution, one-way ANOVA analysis was performed. When samples did not fit the normal distribution, the Kruskal-Wallis test was used to test the null hypothesis that the medians of the variable within each of the levels of samples were the same. Duncan's test was used for multiple mean comparisons. The statistical analysis was carried out using Statgraphics Plus version 5.0. Data were presented as the means and the standard deviations (SD) of each mixture.

In the case of PMS a non-linear regression was

performed in order to fit the BF as a function of the binding time (SPSS 15.0 for Windows). The logistic model permitted the maximum binding force ( $BF_{max}$ ) to be obtained. The binding rate ( $k$ ) was calculated according to Richards function (Causton & Venus, 1981; Romero de Ávila et al., 2010); this assumes that the binding force (BF) increases linearly with time ( $t$ ) from an initial value ( $BF_{ini}$ ) to a maximum value ( $BF_{max}$ ).

$$dBF / dt = k [1 - (\ln BF_{ini} / \ln BF_{max})]$$

### 3. Results and discusión

#### 3.1. Experiments with fibrinogen and thrombin mixture (fibrin gel)

Gelification of the FT systems was affected by the pH and the NaCl concentration (Table 1), obtaining fibrin gels with different rheological features. After F and T were mixed, a minimum gelification time of 35 min was required to perform the rheological analysis. The FT mixtures without salt presented the highest BS at 4-6 hours of mixing (Figure 1A, showed the result corresponding to the FT mixture to pH 8) when stored at 6 and 10 °C. However, the gelification time increased as the temperature of the process dropped. Hence, the FT mixtures kept at 0 °C showed the highest BS at 10 hours (Figure 1A). The same occurred with hardness, at 10 °C they presented the highest value (around  $64 \pm 2$  N) after 6 hours (Table 2A), while at 0 °C they only reached this value after 12 hours (data not shown). The high value of hardness obtained for these gels is in accordance with previous results obtained by other authors (Herrero et al., 2007) and can be attributed to the compact structure derived from the polymerization of the fibrin (Weisel, 2004).

The more stable fibrin gels (greater hardness and BS) were obtained from the FT mixture, with a pH between 7 and 8 (Figure 1B, showed the results obtained for FT at 6 °C) while at pH 5 they did not gelify. These results are related to those obtained by other authors (Chen & Lin, 2002; Álvarez, Bances, Rendueles, & Díaz, 2009), who showed that BS depends on several factors like pH, with an optimum value of 7.0. It has been reported that human thrombin is active in the pH range of 5-10 (Machovich, 1986). However, this enzyme precipitates at pH 5 or less (Machovich, 1986). Fibrinogen shows its isoelectric point at pH 6.5 (Tsai et al., 2006). Several authors (Álvarez et al., 2009) have observed that plasma solubility varies from 80% at pH 3 to complete solubility at pH 8.

The pH of the fibrinogen and thrombin mixture (10/1, v/v) was  $8.29 \pm 0.08$ . No significant differences ( $p > 0.05$ ) in the rheological properties at this pH and those obtained when the pH was adjusted to 8 were detected (Figure 1B).

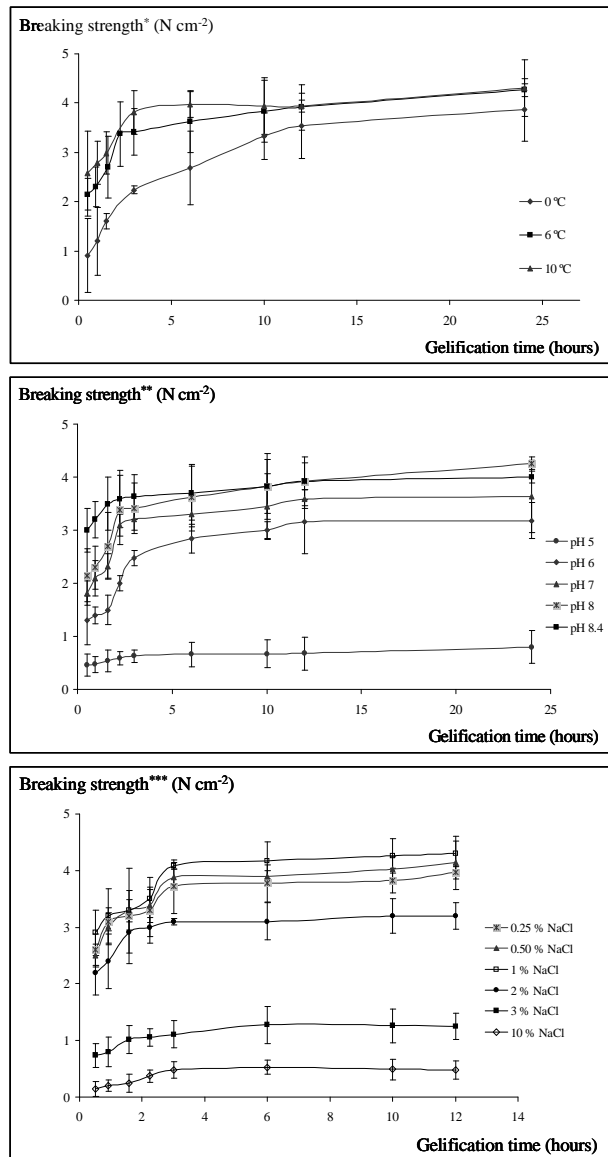
Another important factor for the stability of fibrin gels was the salt concentration. The highest BS values ( $p < 0.05$ ) were reached by the mixtures with a concentration between 0 and 2 % NaCl (Figure 1C showed the result obtained for the FT mixture at pH 8 and at 6 °C). At salt concentrations of 3 %, the gels were less resistant (lower BS values) regardless of gelification time (Figure 1C). With a NaCl concentration of 10 % the gels were very fragile and there was no gelification at all when 20 % NaCl was added.

Table 2A shows the rheological properties of the fibrin gel obtained from mixtures of fibrinogen and thrombin with different NaCl concentrations and adjusted to pH 8. Similar TPA parameters and BS ( $p > 0.05$ ) were obtained with FT mixtures at pH 7 (data not shown). The addition of NaCl at concentrations greater than 2% to FT mixtures reduced the gel hardness, BS and cohesiveness increasing the adhesiveness (Table 2A). These results are in agreement with those obtained in previous works (Herrero et al., 2007). The behavior of this FT gel is similar to that described by De Spirito, Arcóvito, Papi, Rocco, & Ferri, (2003). These authors indicated that when the salt concentration is increased the fibrin fibers are more branched and thinner. Some authors have identified a role for chloride ions as a basic physiological modulator of fibrin polymerization and, therefore, in the formation of fibrinogen gel (Standeven et al., 2005; Papi, Arcovito, De Spirito, Amiconi, Bellelli, & Boumis, 2005). It has been described that  $Cl^-$  specifically binds to the fibrin fibers and opposes the lateral aggregation of protofibrils, resulting in thinner fibers, impeding fibrin polymerization and formation of the gel or three-dimensional clot network (Standeven et al., 2005). However, as can be seen in Table 2A, the highest BS and hardness were reached by the FT mixture with NaCl concentration less than 2 %. This result could be related with the fact that thrombin may be most active at pH 8 in the presence of at least 0.1 M NaCl (Barrett, Rawlings, & Woessner, 2004).

Figure 2A shows the images obtained by scanning electron microscopy (SEM) of the fibrin gel with different salt concentrations (0, 2 and 10 %). The BS of the gels without salt or with 1 % NaCl can be correlated with the structure of the network and its high density. These gels showed microfibrils forming

a structured and very compact matrix, explaining its high resistance. However, with 10 % NaCl the structure is sponge-like and porous, with little organization of the fibrils, although still presenting the structure of an organized gel.

**Fig. 1.** Effect of (A) gelification temperature, (B) pH and (C) NaCl concentration of fibrinogen-thrombin mixture on breaking strength ( $\text{N cm}^{-2}$ ) of fibrin gel



\* Mixture of fibrinogen and thrombin (10/1, v/v) at pH 8

\*\* Mixture of fibrinogen and thrombin (10/1, v/v) stored at 6 °C

\*\*\* Mixture of fibrinogen and thrombin (10/1, v/v) adjusted to pH 8 and stored at 6 °C

### 3.2. Experiments with meat emulsion supplemented with FT mixture

The results obtained with the FT mixture could be employed to establish good conditions to work with FT as a cold-set binder. These corresponded to: a pH between 7 and 8, NaCl at concentrations no higher than 2% and binding times longer than 6 hours (Figure 1A, 1B and 1C). As mentioned above the pH of the FT mixture was  $8.28 \pm 0.11$  and the meat emulsions showed pH values of  $5.73 \pm 0.03$ . To elaborate the ME-FT models (Table 1), the pH resulting from the mixing of ME and FT was adjusted to  $7.4 \pm 0.02$  and ME-FT mixtures (Table 2B) were elaborated with salt concentrations of 0, 0.25, 0.5 and 2% of NaCl. The ME-FT mixtures were kept at 6 °C for 12 hours to ensure adequate binding. The rheological features are shown in Table 2B and it can be observed how the addition of FT in the ME produced an increase ( $p < 0.05$ ) in hardness, cohesiveness and BS, proportional to the percentage of FT incorporated. The ME-FT mixtures with final concentrations of 0.25 – 0.5 % NaCl and levels of FT addition from 10-20 % showed greater hardness, cohesiveness and BS than the ME-FT with 2 % NaCl (Table 2B). These results are probably caused by the fact that the low salt concentration (0.25 - 0.5 %) allows the myofibrillar protein partial solubilization (Gordon & Barbut, 1992) but did not affect the fibrin gel formation. Several authors (Álvarez et al., 2009) reported that the addition of salt (about 0.075 %) increases the protein-emulsifying capacity because protein folding is induced. The results of hardness and cohesiveness obtained for ME-FT with 0 – 2 % NaCl and 10 % of FT can be found within the interval of values obtained for restructured meats and meat models systems made with fibrinogen and thrombin (Flores, Boyle, & Kastner, 2007; Herrero et al., 2007). ME without FT and NaCl showed the highest ( $p < 0.05$ ) adhesiveness and the lowest ( $p < 0.05$ ) hardness and cohesiveness. These results indicated a pseudoplastic fluid behavior for this system because of a lack of myofibrillar protein gelification (Herrero et al., 2007). Figure 2B shows the images obtained by scanning electron microscopy (SEM) of the ME-FT (without salt) with addition of 0, 5 and 10 % of FT. It can be observed how the structural organization increases as FT is added. FT promotes aggregation and cross-linking, especially at the highest concentration (10 %). The fibrin gel is found in the myofibrillar structure and occupying the spaces, giving the appearance of a dense and compact matrix.

From these experiments it can be deduced that binding can be achieved at cold temperatures (12 h at 6 °C) to form stable meat emulsions that

incorporate at least 10 % of the F-T mixture (10/1, v/v) although this must be increased to 20 % to achieve resistances to forces greater than 1 N cm<sup>-2</sup>.

**Table 2.** Rheological properties of (A) fibrin gel obtained from mixtures of fibrinogen and thrombin (10/1 v/v) with different NaCl concentration\* and (B) meat emulsion (ME) supplemented with mixtures of fibrinogen and thrombin (FT) and NaCl (ME-FT mixtures)\*\*

<b>A: Fibrin gel</b>						
<b>NaCl</b>		<b>Hardness</b>	<b>Adhesiveness</b>	<b>Cohesiveness</b>	<b>Springiness</b>	<b>Breaking strength</b>
(%, v/w)		(N)	(N s) (-1)		(m)10 <sup>-2</sup>	(N cm <sup>-2</sup> )
0		64.2±2.4a	0.65±0.04c	0.64±0.04a	0.37±0.03a	3.17±0.27a
0.25		63.8±2.8a	0.65±0.05c	0.66±0.05a	0.40±0.04a	2.98±0.31a
0.5		63.7±2.9a	0.68±0.03c	0.64±0.03a	0.38±0.03a	3.08±0.28a
1		61.2±3.2a	0.69±0.04c	0.68±0.04a	0.35±0.02a	3.02±0.30a
2		52.4±3.7b	0.72±0.05b,c	0.60±0.05a,b	0.36±0.03a	1.36±0.23b
3		15.8±4.4c	0.8±0.09b	0.56±0.05b,c	0.33±0.04a	0.52±0.14c
10		5.3±3.4d	1.2±0.08a	0.48±0.03c	0.32±0.04a	0.22±0.09d
<b>B: ME-FT mixtures</b>						
<b>NaCl</b>	<b>FT</b>					
(%, w/w)	(%, w/v)					
0	0	4.9±0.3i	1.11±0.31a	0.45±0.03c	0.32±0.09b	n.d
0	10	14.5±1.3g	0.65±0.08b	0.53±0.03a,b	0.50±0.02a	0.52±0.24c
0	20	20.5±2.2e,f	0.60±0.05b	0.54±0.03a	0.52±0.04a	0.72±0.24c
0	30	28.8±2.6d	0.57±0.08b,c	0.58±0.04a	0.45±0.03a	0.79±0.34c
0	40	38.5±2.8c	0.52±0.13b,c	0.61±0.05a	0.44±0.03a	1.46±0.11b
0	50	59.1±2.5a	0.47±0.07c	0.61±0.04a	0.46±0.04a	2.92±0.27a
0.25	0	5.3±0.5i	1.22±0.22a	0.46±0.03b,c	0.34±0.04b	n.d
0.25	10	14.0±2.2g	0.66±0.07b	0.53±0.02a,b	0.48±0.03a	0.50±0.17c
0.25	20	19.9±2.8e,f	0.62±0.06b	0.55±0.02a	0.43±0.03a	0.70±0.28c
0.25	30	28.3±2.9d	0.55±0.08b,c	0.56±0.02a	0.44±0.03a	0.77±0.22c
0.25	40	37.6±3.2c	0.56±0.13b,c	0.58±0.03a	0.48±0.03a	1.54±0.20b
0.25	50	58.7±3.0a	0.48±0.06c	0.60±0.05a	0.45±0.02a	2.78±0.31a
0.5	0	5.7±0.5i	1.50±0.31a	0.48±0.3b,c	0.36±0.03b	n.d
0.5	10	11.4±1.5g	0.69±0.08b	0.52±0.03a,b	0.45±0.02a	0.48±0.21c
0.5	20	18.4±3.1f	0.64±0.08b	0.54±0.03a,b	0.44±0.03a	0.64±0.18c
0.5	30	26.7±3.0d	0.59±0.06b,c	0.59±0.04a	0.45±0.03a	0.69±0.09c
0.5	40	35.5±3.3c	0.58±0.5b,c	0.60±0.04a	0.45±0.04a	1.34±0.31b
0.5	50	54.2±2.7a	0.54±0.06b,c	0.66±0.04a	0.43±0.02a	2.12±0.35a
2.0	0	4.7±0.8i	1.70±0.31a	0.49±0.02b,c	0.39±0.02b	n.d
2.0	10	7.1±0.6h	0.67±0.09b	0.51±0.03b,c	0.46±0.03a	0.35±0.29c
2.0	20	11.4±0.8g	0.66±0.06b	0.53±0.03a,b	0.45±0.03a	0.45±0.16c
2.0	30	23.5±1.4e	0.62±0.07b	0.55±0.02a	0.44±0.02a	0.47±0.09c
2.0	40	34.8±1.8c	0.59±0.9b,c	0.56±0.02a	0.45±0.03a	0.84±0.33b
2.0	50	43.9±2.1b	0.60±0.11b,c	0.58±0.02a	0.44±0.02a	1.15±0.37a

a,b,c,...i: Different letters in the same column for the same system indicate significant differences ( $p < 0.05$ )

\* A volume of 100 mL of fibrinogen was mixed with the corresponding amount of NaCl to obtain final concentrations in the FT mixture of 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 10, 20 % of NaCl (v/w) and then thrombin (10 mL) was added. pH adjusted to 8 and samples were stored for 12 h at 6 °C

\*\* Meat batter with water or NaCl aqueous solution (100 parts of pork and 11 parts of water or NaCl aqueous solution, w/w). The NaCl aqueous solutions were elaborated to obtain a concentration of 0.25, 0.5 and 2 % of NaCl in the final mixture ME-FT. Fibrinogen and thrombin (10 part of fibrinogen and 1 part of thrombin, v/v) was incorporated in the amount required to obtain a certain percentage of FT in the final mixture ME-FT (w/v). pH was adjusted to 7.4 and ME-FT mixtures were stored for 12 h at 6 °C



### 3.3. Experiments with pork model systems

To restructure the fresh pork portions, mixtures of FT were used with a pH of 8 and pre-treatments of the meat surfaces without salt (U) and with salt (I and SS) were considered (Table 1).

Figure 3A shows the development of the BF ( $\text{N cm}^{-2}$ ) during binding time (up to 24 hours) for different pork model systems (PMS). The BF was significantly affected ( $p < 0.05$ ) by the pre-treatment of the meat surfaces (U, I and SS) and the packing procedure (A or V). The results allowed the maximum binding force ( $BF_{max}$ ) to be obtained, after which the binding rate ( $k$ ) could be determined (Figure 3A and Table 3). In general, a setting time in the range of 4 - 6 hours was sufficient to reach the  $BF_{max}$  in the different types of pork model systems (Figure 3A). After the binding time, the BF remained relatively stable over time. The lowest BF ( $0.57 \pm 0.22 \text{ N cm}^{-2}$ ) and  $k$  ( $0.08 \text{ N cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ) were observed for PMS in which the meat surface was previously treated with the SS procedure (PMS-SS) (Table 3); this is probably because of the residual salt content on the meat surface, giving these meat model systems features that are inadequate for the cross-linking reaction by FT as the cold-set binding agent. These results are similar to those obtained when plasma protein is used to restructure meat (Romero de Ávila, Ordóñez, Escudero, & Cambero, 2013), which may be associated with the findings of several authors (Papi et al., 2005) about the effect of chloride ions on fibrin gel formation as mentioned previously.

The highest ( $p < 0.05$ ) values of  $BF_{max}$  ( $2.5 \pm 0.25 \text{ N cm}^{-2}$ ) and  $k$  ( $0.33 - 0.45 \text{ N cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ) were reached by the PMS elaborated following the I pre-treatment procedure [meat surface immersed in aqueous solution of a mixture of salts (NaCl with 200 ppm of  $\text{KNO}_3$ , and 100 ppm of  $\text{NaNO}_2$ ) at 3 % (w/v) for 10 min] packed at atmospheric pressure or vacuum (PMS-I-A and PMS-I-V). The PMS elaborated with untreated meat (PMS-U) showed adequate cohesion, with a  $BF_{max}$  higher than  $1 \text{ N cm}^{-2}$ . Vacuum packing of all PMS (PMS-I, PMS-U and PMS-SS) did not increase the  $BF_{max}$  ( $p > 0.05$ ) although the  $k$  ( $p < 0.05$ ) of the PMS-I did (Table 3).

The binding forces detected in the different PMS may be attributed to the three-dimensional network formed throughout the process of fibrin polymerization, which is responsible for the mechanical properties of the fibrin gels or clots (Herrero et al., 2007; Weisel, 2004). The results obtained suggest that the most appropriate

**Table 3.** Binding parameters [rate ( $k$ ) and maximum binding force ( $BF_{max}$ )] reached by restructured pork samples\* using fibrinogen and thrombin mixture (FT) as cold-set binding during the binding, after salting (post-salting) and drying periods

Pork model system (PMS)		
Model complex	Binding Period (0 - 24 hours)	
	$k$	$BF_{max}$
	( $\text{N cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ )	( $\text{N cm}^{-2}$ )
PMS-U-A	$0.29 \pm 0.04, \text{b}$	$1.66 \pm 0.29 \text{b}$
PMS-U-V	$0.32 \pm 0.03 \text{b}$	$1.69 \pm 0.35 \text{b}$
PMS-I-A	$0.33 \pm 0.04 \text{b}$	$2.55 \pm 0.25 \text{a}$
PMS-I-V	$0.45 \pm 0.04 \text{a}$	$2.47 \pm 0.29 \text{a}$
PMS-SS-A	$0.08 \pm 0.03 \text{c}$	$0.57 \pm 0.22 \text{c}$
PMS-SS-V	$0.15 \pm 0.04 \text{c}$	$0.65 \pm 0.28 \text{c}$

Processing of deboned leg (RDL)		
Procedure	Post-salting (RDL-PS)	Drying period (RDL-D)
	(0.75 days /kg)	(10 weeks)
	$BF_{max}$	$BF_{max}$
	( $\text{N cm}^{-2}$ )	( $\text{N cm}^{-2}$ )
U-A	$1.03 \pm 0.44 \text{b}$	$1.51 \pm 0.55 \text{c}$
U-V	$0.98 \pm 0.56 \text{b}$	$1.46 \pm 0.57 \text{c}$
U-vS	$0.97 \pm 0.42 \text{b}$	$3.21 \pm 0.49 \text{b}$
I-A	$2.06 \pm 0.22 \text{a}$	$4.9 \pm 0.71 \text{a}$
I-V	$2.10 \pm 0.29 \text{a}$	$5.01 \pm 0.69 \text{a}$
I-vS	$2.04 \pm 0.48 \text{a, b}$	$5.4 \pm 0.73 \text{a}$
I-FT 0.25-A	$1.78 \pm 0.57 \text{a, b}$	$4.31 \pm 0.51 \text{a}$
I-FT 0.25-vS	$1.98 \pm 0.43 \text{a, b}$	$5.98 \pm 0.51 \text{a}$
SS-A	$0.56 \pm 0.21 \text{b}$	$1.51 \pm 0.47 \text{c}$
SS-V	$0.65 \pm 0.21 \text{b}$	$1.71 \pm 0.71 \text{c}$
SS-vS	$0.51 \pm 0.13 \text{b}$	$2.42 \pm 0.67 \text{b, c}$

a,b,c: Different letters in the same column indicate significant differences ( $p < 0.05$ )

\*PMS: Meat model system; RDL: Restructured deboned leg (PS: post-salting; D: dry); U: model prepared with untreated meat; I: model prepared with meat immersed in aqueous solution of a mixture of salts [(NaCl with 200 ppm of  $\text{KNO}_3$ , and 100 ppm of  $\text{NaNO}_2$ ) at 3% (w/v) for 10 min]; SS: model prepared with salted meat [mixture of salts (NaCl with 200 ppm of  $\text{KNO}_3$ , and 100 ppm of  $\text{NaNO}_2$ ) was evenly distributed on the binding surface which was then washed with aqueous solution of the mixture of salts at 3% (w/v)]; FT0.25: fibrinogen and thrombin mixed with a 0.23 % of salts (NaCl with 200 ppm of  $\text{KNO}_3$ , and 100 ppm of  $\text{NaNO}_2$ ); A: model systems packed at atmospheric pressure; V: model systems packed at vacuum; vS: meat model covered with a dry mixture of salts (NaCl with 200 ppm of  $\text{KNO}_3$ , and 100 ppm of  $\text{NaNO}_2$ ) in a plastic bag closed at vacuum

procedure for restructuring fresh pork using FT would be preliminary meat treatment by immersion in the afore-mentioned saline solution, and additional vacuum packing would not be necessary. These results differ from those obtained by other cold-set binding agents, such as microbial transglutaminase, in which the vacuum-packing improved the binding process between meat pieces because it favoured the contact of the meat surfaces and thus the formation of more cross-links (Yokoyama, Nio, & Kikuchi, 2004; Romero de Ávila et al., 2010). However, in the case of FT, the gel formed probably contacts and interacts with the meat surface without requiring these to be moved closer to promote their binding. The positive effect of immersing the pork in aqueous saline solution prior to the FT application and cold-set binding could be attributed to the salt-induced solubilization of superficial myofibrillar proteins (Ramírez, Uresti, Téllez, & Vázquez, 2002). The images obtained by scanning electron microscopy (Figure 2C) of the binding area of the PMS-I-V suggest a cold-set gelation process of the FT with different degrees of connection on the meat surface. This organization would explain the high BF value. Two clearly distinct structures could be observed in the binding area of this PMS-I (Figure 2C); one in the central part of similar characteristics to fibrin gels and, another, of lower density, in the area of contact between the meat surfaces, in which filaments were observed connecting the fibrin gels with the muscle bundles.

A fibrillar structure similar to that found in the gelification of the ME-FT mixture (Figure 2B) and in the binding areas of PMS (Figure 2C) has been observed in chitosan matrices processed with fibrin (Chung, Yang, & Tsai, 2006).

It is interesting to note that, because of the rapid formation of fibrin clots (i.e. 15 min), FT was applied to the meat surfaces immediately after mixing. However, it has been observed that pre-gelified mixtures of FT (10 minutes after mixing) still have the ability to bind or join meat surfaces, but the BF values are lower than those obtained by mixtures applied to meat surfaces in liquid form.

### 3.4. Experiments with fresh deboned legs

To check the value of FT for manufacturing restructured dry ham, 55 meat pieces obtained from fresh deboned leg were processed using the different meat pre-treatments (U, I, SS) and packing procedures described here (A, V, vS) (Table 1). The FT-restructured fresh deboned legs (RDL) were

salted and dried following a commercial process (Santos et al., 2008) to obtain dry cured meat pieces (RDL-D). The changes in the binding force (BF) throughout this process are shown in Figure 3B. The RDL showed similar  $BF_{max}$  values to those obtained with the PMS manufactured in analogous conditions, and a binding time of 10 hours at 6 °C was sufficient to achieve the  $BF_{max}$ . In general, significant differences were not observed ( $p > 0.05$ ) between RDL (prior salting) and RDL-PS (after salting) (Figure 3B). The BF of the RDL-PS tended to be higher during the drying period to obtain the restructured dry deboned ham (RDL-D). This same result has been obtained in previous works for the cold-set binding of restructured dry ham using different binding agents (Romero de Ávila et al., 2010, 2013) and has been related to the decreased water contents, as the water holding capacity and the salt contents increase. Several authors (Virgili, Parolari, Schivazappa, Soresi-Bordini, & Borri, 1995) found a positive correlation between the hardness of dry cured ham and the salt concentration. It is assumed that hardness and chewiness increase during the initial steps of processing due to a decrease in the protein solubility and water content (Monin, Marinova, Talmant, Martín, Cornet, Lanore, & Grasso, 1997).

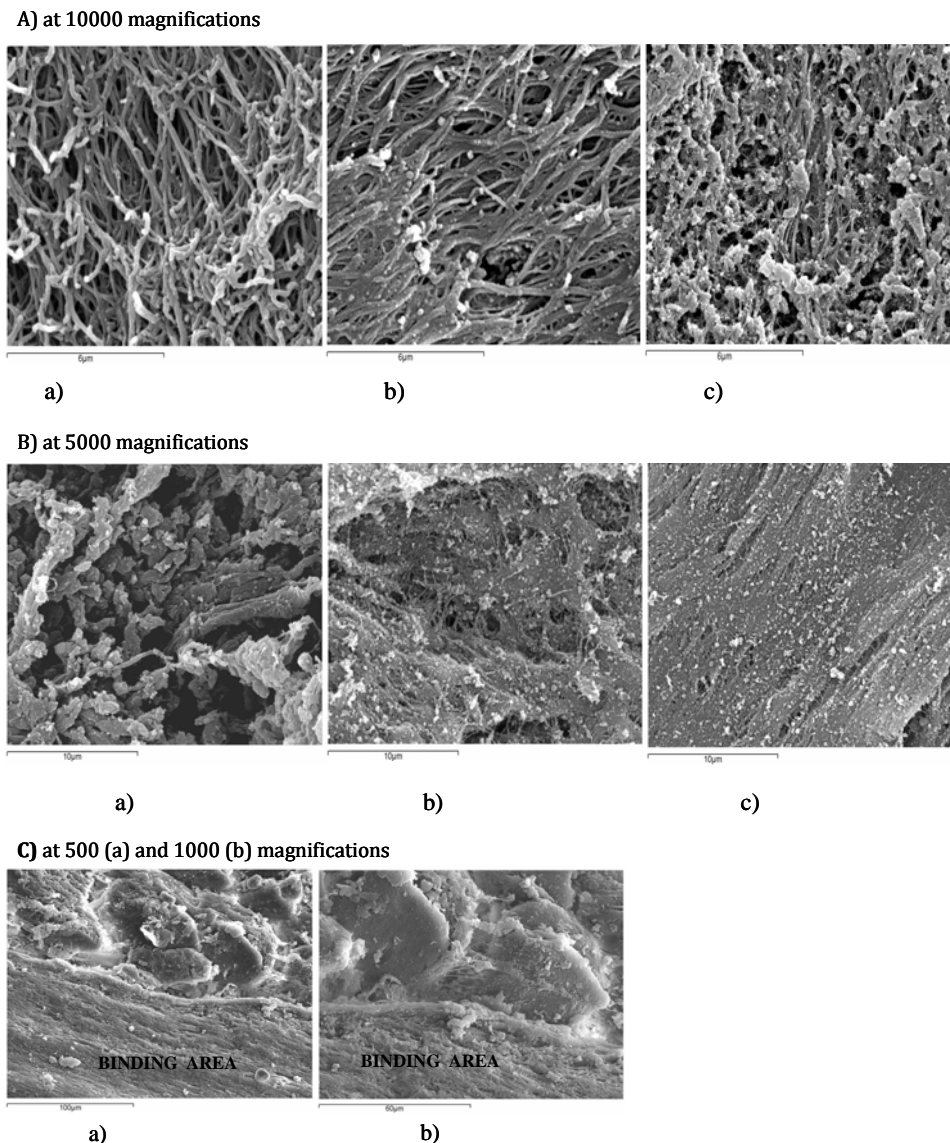
The highest ( $p < 0.05$ ) values of BF were reached in the restructured meat pieces elaborated with meat surfaces immersed in aqueous solution following procedure I (RDL-I) (Figure 3B). In this case, no effect ( $p > 0.05$ ) of the packing procedure used during the binding time was detected and similar  $BF_{max}$  (Table 3) have been observed when the RDL-I were packed at atmospheric pressure (RDL-I-A) and at vacuum (RDL-I-V). It is also possible to vacuum pack after the RDL-I has been covered with dry salt following the simultaneous binding and salting procedure (RDL-I-vS) without modifying the  $BF_{max}$  (Table 3).

The RDL-D manufactured with untreated meat (RDL-U-A, RDL-U-V, RDL-U-vS) and pre-treated with salt mixtures (RDL-SS-A, RDL-SS-V and RDL-SS-V) showed lower  $BF_{max}$  values ( $p < 0.05$ ) (Table 3 and Figure 3B). However, the binding forces presented by these RDL-D are similar to the breaking strengths shown by some meat products (Herrero et al., 2007; Herrero et al., 2008), which implies good resistance to handling and the manufacturing process, including slicing. The vS packing increased the  $BF_{max}$  ( $p < 0.05$ ) of the RDL-D obtained by untreated (U) meat surface (RDL-D-U-vS). To some degree, these results differ from those obtained with plasma powder for the cold-set binding of restructured dry ham (Romero de

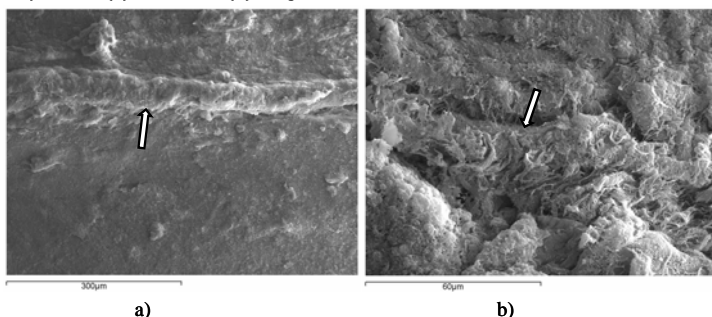
Ávila et al., 2013). Using plasma powder it was not possible to bind meat portions if the meat had been treated previously with salt or if meat pieces covered with salt had been treated previously (simultaneous binding and salting procedure). Plasma powder contains a complex mixture of proteins, including fibrinogen and blood plasma enzymes (Roodink & Zuijdweg, 2003). However, the concentrations of these last two components are much lower than in the fibrinogen and thrombin mixtures used in this work. The differences in the results could be due to

the fact that the FT mixtures provide much denser fibrin gels. The results obtained suggest that the increase in pressure and the absorption of water by salt from around the meat portions during vS packing can facilitate the meat-protein interaction and stabilize the network (Figure 2D and 2E). Figure 2E shows a dry-cured deboned leg restructured following the RDL-D-I-vS procedure. As can be observed, after cutting the restructured meat piece, the binding area was imperceptible.

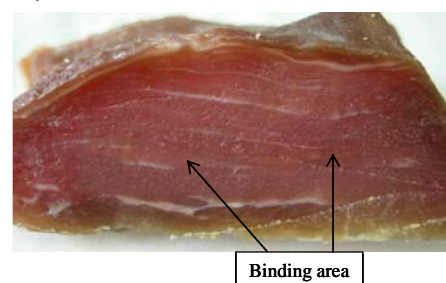
**Fig. 2.** Scanning electronic microscopy (SEM) using secondary electron images of (A) fibrin gel obtained from mixtures of fibrinogen and thrombin (10/1 v/v, FT) without NaCl addition (a) and with 2 % (b) and 10 % (c) of NaCl in the final mixture, (B) meat emulsion without FT (a) and supplemented with 10 % (b) and 20 % (c) of FT, (C) binding areas from restructured fresh pork model system (PMS-I-V\*) and (D) restructured deboned dry ham (RDL-D-I-vS\*\*). (E) Image of a cross section of a restructured deboned dry piece (RDL-D-I-vS\*\*)



D) at 500 (a) and 1000 (b) magnifications



E)



\* PMS-I-V: pork model system elaborated with meat surface immersed in aqueous solution and vacuum packing as indicated in Table 1

\*\* RDL-D-I-vS: restructured deboned dry leg elaborated with meat surface immersed in aqueous solution and vacuum packing with salts as indicated in Table 1

To reduce the potential for microbial growth in the binding zone, FT with 0.25 % of the salt mixture (NaCl with 200 ppm of  $\text{KNO}_3$ , and 100 ppm of  $\text{NaNO}_2$ ) was evenly distributed on the meat surface pre-treated with procedure I (RDL-FT-0.25-I) and packed using the A and vS procedure. Five deboned legs were used for each restructured processes and the corresponding RDL-D were elaborated and the BF were compared with previously assayed RDL-D. The BF of RDL-D-FT-0.25-I-A and RDL-D-FT-0.25-I-vS were close to values reached for RDL-D-I-A and RDL-D-I-vS (Table 3).

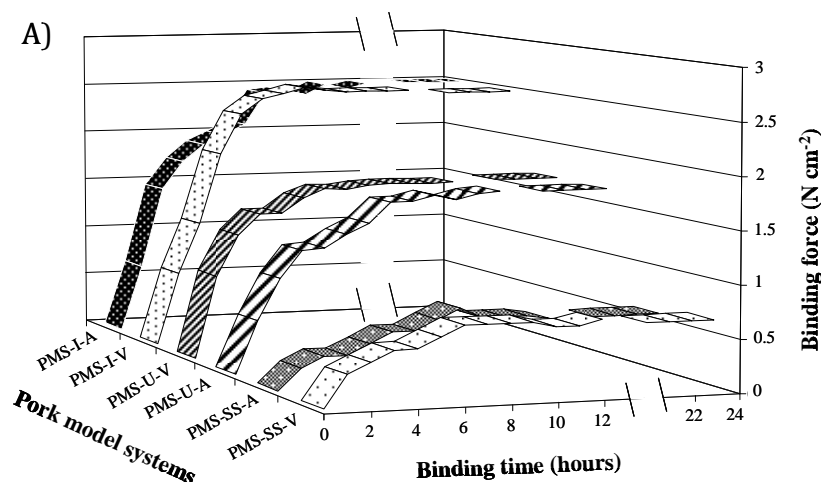
Because of these results, in general, the use of meat pre-treated by salt solution (I), FT mixture (10/1, v/v) and simultaneous salting and vacuum packing (vS) set at 6 °C offered the most satisfactory binding behavior of the FT when used as cold-set binding to restructure deboned legs.

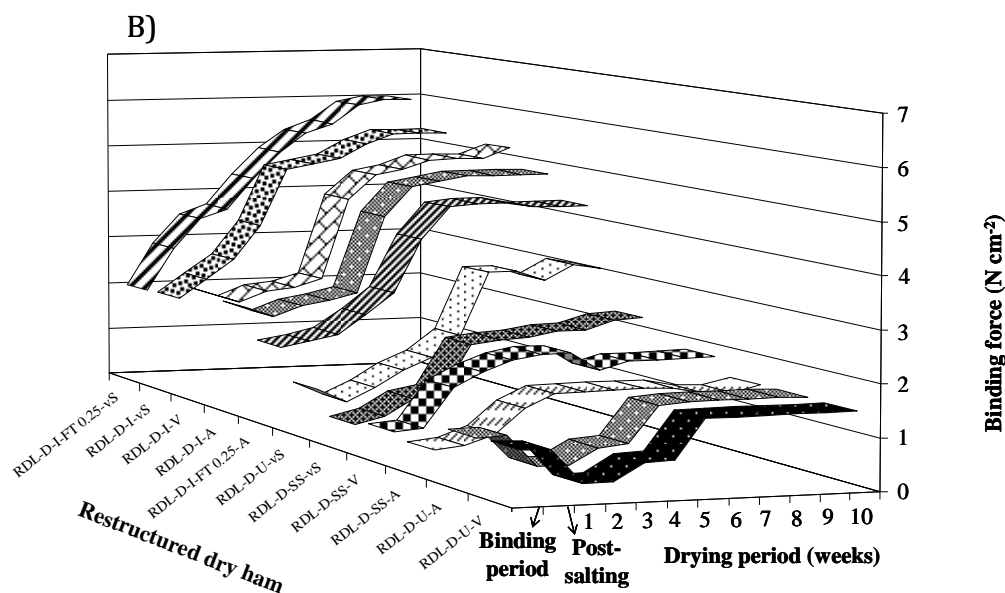
The images (Figure 2D) obtained by scanning electron microscopy (SEM) of the dry restructured deboned ham (RDL-D-I-vS) show a binding area

clearly distinct from the muscle structure. The binding area seems to correspond to a homogeneous, highly-structured and compact fibrin gel. In the case of RDL-D-I-vS, the FT creates a mesh-like structure which interweaves with the muscle fiber, which would explain the high BF of these RDL-D. When FT was applied to the meat pre-treated by procedure U or SS the resulting structure was less compact and a three-dimensional network was observed with interconnections between the muscle fibers.

This image is different from that corresponding to the binding area of dry ham restructured by plasma powder (Romero de Ávila et al., 2013). In this case, the drying produced a retraction of the binding area, resulting in a less visible binding structure. However, the binding area corresponding to the FT mixture is more visible and shows a gel-like structure. In both cases, the results obtained suggest that a stable three-dimensional network has developed.

**Fig. 3.** (A) Binding force ( $\text{N cm}^{-2}$ ) development in restructured fresh pork model systems (PMS)\* as affected by the meat pre-treatment and packing procedure and (B) binding force ( $\text{N cm}^{-2}$ ) evolution during the binding, salting and drying periods of restructured deboned leg (RDL)\*





\* U, I, SS pre-treatments of the meat surface and A, V and vS packing procedure as indicated in Table 1

#### 4. Conclusions

The mixture of fibrinogen and thrombin (FT) can be used for restructuring deboned pork leg to manufacture dry-cured ham on a practical scale, since it provides fully stable cross-links in the course of the salting and drying processes. To optimize the process, it is necessary to pre-treat the meat surface by immersion in salt solution ( $\text{NaCl}$  including  $\text{KNO}_3$  and  $\text{NaNO}_2$ ) and to uniformly spread a FT mixture (10/1, v/v), without or with 0.25 % of the mixture of salts, over it; this can then be followed by vacuum packing of the meat portions covered in salt. This vacuum packing procedure allows simultaneous binding and salting processes to take place effectively in the manufacture of dry-cured ham.

#### Acknowledgements

The authors are grateful for the financial support of projects AGL2010-19158 and CARNISENUSA (CSD2007-00016), included in the CONSOLIDER-INGENIO 2010 issue (Ministerio de Educación y Ciencia). SEM facilities were provided by the "ICTS Centro Nacional de Microscopía Electrónica" by Eugenio Baldonado.

#### References

- Álvarez, C., Bances, M., Rendueles & Díaz, M. (2009). Functional properties of isolated porcine blood proteins. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 807–814.
- Barrett, A. J., Rawlings, N. D., & Woessner, J. F. (2004). Thrombin. In: *Handbook of proteolytic enzymes*. 2<sup>nd</sup> Edition, vol. 2, Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp. 1667–1672.
- Cambero, M. I., López, M. O., de la Hoz, L., & Ordóñez, J. A. (1991). Restructured meat. Composition and binding-properties. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 31, 293–309.
- Causton, D. R., & Venus, J. C. (1981). *The biometry of plant growth*. London: Edward Arnold Ltd.
- Chen, M. J. & Lin, C. W. (2002). Factors affecting the water-holding capacity of fibrinogen/plasma protein gels optimized by response surface methodology. *Journal of Food Science*, 67, 2579–2582.
- Chung, T. W., Yang, M. C., & Tsai, W. J. (2006). A fibrin encapsulated liposomes-in-chitosan matrix (FLCM) for delivering water-soluble drugs Influences of the surface properties of liposomes and the crosslinked fibrin network. *International Journal of Pharmaceutics*, 311, 122–129.
- De Spirito, M., Arcóvito, G., Papi, M., Rocco, M., & Ferri, F. (2003). Small and wide-angle elastic light scattering study of fibrin structure. *Journal of Applied Crystallography*, 36, 636–641.
- Dimitrakopoulou, M. A., Ambrosiadis, J. A., Zetou, F. K., & Bloukas, J. G. (2005). Effect of salt and transglutaminase (TG) level and processing conditions on quality characteristics of phosphate-free, cooked, restructured pork shoulder. *Meat Science*, 70, 743–749.
- Elizalde, I. (2008). El jamón español se prepara para hablar mandarín. *Expansión, Edición impresa*. March 25.

- Flores, N. C., Boyle, E. A. E., & Kastner, C. L. (2007). Instrumental and consumer evaluation of pork restructured with activa (TM) or with fibrinex (TM) formulated with and without phosphate. *Lwt-Food Science and Technology*, 40, 179–185.
- Gentry, P. A. (2004). Comparative aspects of blood coagulation. *The Veterinary Journal*, 168, (3), 238–251.
- Gordon, A., & Barbut, S. (1992). Mechanisms of meat batter stabilization: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32, 299–332.
- Herrero, A. M., Cambero, M. I., Ordóñez, J. A., Castejón, D., Romero de Ávila, M. D., & de la Hoz, L. (2007). Magnetic Resonance Imaging, rheological properties and physico-chemical characteristics of meat systems with fibrinogen and thrombin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9357–9364.
- Herrero, A. M., Cambero, M. I., Ordóñez, J. A., de la Hoz, L., & Carmona, P. (2009). Plasma powder as cold-set binding agent for meat system: Rheological and Raman spectroscopy study. *Food Chemistry*, 113, 493–499.
- Herrero, A. M., de la Hoz, L., Ordoñez, J. A., Herranz, B., Romero de Ávila, M. D., & Cambero, M. I. (2008). Tensile properties of meat cooked sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) parameters and physico-chemical characteristics. *Meat Science*, 80, 690–696.
- Machovich, R. (1986). Choices among the possible reaction routes catalyzed by thrombin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 485, 170–183.
- Monin, G., Marinova, P., Talmant, A., Martín, J. F., Cornet, M., Lanore, D., & Grasso, F. (1997). Chemical and structural changes in dry-cured hams (Bayonne hams) during processing and effects of the dehairing technique. *Meat Science*, 42, 29–47.
- Paardekooper, E. J. C., & Wijngaards, G. (1988). Composite meat product and method for the manufacture thereof. *International Patent No. 8501333*. Netherlands, issued May 3.
- Papi, M., Arcovito, G., De Spirito, M., Amiconi, G., Bellelli, A., & Boumis, G. (2005). Simultaneous static and dynamic light scattering approach to the characterization of the different fibrin gel structures occurring by changing chloride concentration. *Applied Physics Letters*, 86, 183901–183903.
- Ramírez, J., Uresti, R., Téllez, S., & Vázquez, M. (2002). Using salt and microbial transglutaminase as binding agents in restructured fish products resembling hams. *Journal of Food Science*, 67, 1778–1784.
- Romero de Ávila, M. D., Ordóñez, J. A., De la Hoz, L., Herrero, A. M., & Cambero, M. I. (2010). Microbial transglutaminase for cold-set binding of unsalted/salted pork models and restructured dry ham. *Meat Science*, 84, 747–754.
- Romero de Ávila, M. D., Ordóñez, J. A., Escudero, R., Cambero, M. I. (2013). A study of plasma powder for cold-set binding of pork and restructured dry ham. *Meat Science*, under review.
- Roodink, H. B. J., & Zuijdweg, P. (2003). Preparation of blood plasma powder for bonding together pieces of foodstuff, e.g. meat, involves preparing fibrinogen concentrate from blood plasma, and spray-drying fibrinogen concentrate to form powder. *Patent Number(s): WO2003063607-A, WO2003063607-A1, NL1019873C2, AU2003203315-A1, EP1469740-A1, US2005170068-A1*.
- Santos, C., De la Hoz, L., Cambero, I., Cabeza, C., & Ordóñez, J. A. (2008). Enrichment of dry cured ham with  $\alpha$ -linolenic acid and  $\alpha$ -tocopherol by the use of linseed oil and  $\alpha$ -tocopheryl acetate in pig diets. *Meat Science*, 80, 668–674.
- Standeven, K. F., Ariëns, R. A. S., & Grant, P. J. (2005). The molecular physiology and pathology of fibrin structure/function. *Blood Reviews*, 19, 275–288.
- Tsai, C. M., Tseng, T. F., Yang, J. H., & Chen, M. T. (2006). Study on a binder by using porcine blood plasma transglutaminase, thrombin and fibrinogen. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 19, 137–143.
- Vigneron, X. (1988). Restructuration des viandes. *Viandes Produits Carnés*, 9, 182–186.
- Virgili, R., Parolari, G., Schivazappa, C., Soresi-Bordini, C., & Borri, M. (1995). Sensory and texture quality of dry-cured ham as affected by endogenous cathepsin B activity and muscle composition. *Journal of Food Science*, 60, 1183–1186.
- Weisel, J. W. (2004). The mechanical properties of fibrin for basic scientists and clinicians. *Biophysical Chemistry*, 112, 267–276.
- Yokoyama, K., Nio, N., & Kikuchi, Y. (2004). Properties and applications of microbial transglutaminase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 447–454.



## *V. DISCUSIÓN GENERAL*





## V. DISCUSIÓN GENERAL

### PREÁMBULO

*En la presente tesis doctoral se han afrontado dos líneas de trabajo distintas. Por una parte, se han estudiado las características reológicas de un amplio abanico de productos cárnicos existentes en el mercado. Por otra, se ha analizado el potencial de agentes de ligazón en frío para la reestructuración de piezas cárnicas así como el efecto de distintas variables en su mecanismo de acción. Se considera que cada línea ha dado lugar no solo a resultados de interés científico y técnico, sino que su confluencia ha aportado la información requerida para un mejor planteamiento y desarrollo del objetivo final de la tesis: elaborar jamón curado a partir de perniles reestructurados.*

*En este apartado de la memoria se discuten las distintas experiencias realizadas en conjunto, la conexión existente entre ellas y la relación entre los resultados obtenidos. Finalmente, se analizan y contrastan los datos obtenidos en el contexto en el que se han desarrollado.*

### V.1. ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES REOLÓGICAS DE PRODUCTOS CÁRNICOS COMERCIALES MEDIANTE ANÁLISIS DE PERFIL DE TEXTURA Y ENSAYOS DE TRACCIÓN

La industria cárnica elabora una amplia variedad de productos cárnicos que pueden clasificarse en función de diferentes criterios (fundamentalmente derivados de su proceso de elaboración y origen). En el desarrollo de la presente tesis doctoral se ha realizado un estudio de las propiedades reológicas de un amplio número de productos cárnicos comercializados en España, desde embutidos fermentados (apartado IV. Resultados, Capítulo 1, artículo 1.1) hasta productos cocidos obtenidos de emulsiones cárnicas estabilizadas por el calor (apartado IV. Resultados, Capítulo 1, artículo 1.2) o elaborados a partir de porciones cárnicas íntegras (apartado IV. Resultados, Capítulo 1, artículo 1.3), todos ellos fabricados con carne de distintas especies (fundamentalmente cerdo, pollo y pavo). Finalmente se ha realizado un análisis detallado del comportamiento mecánico de distintos tejidos de jamón curado (apartado IV. Resultados, Capítulo 1, artículo 1.4), producto en el que se pretenden aplicar los resultados de esta tesis doctoral.

En conjunto, en estos estudios se ha utilizado el análisis del perfil de textura (TPA) y un ensayo de tracción uniaxial destructivo. El TPA es el ensayo de compresión más utilizado en el estudio de productos cárnicos y son muchas las referencias que podrían citarse en este campo (Bruna y col., 2000; Gimeno y col., 2000; Herranz y col., 2005; Muguerza y col., 2003). Los ensayos de tracción se emplean habitualmente en los materiales para estudiar la tenacidad (resistencia a la ruptura y capacidad de absorber energía antes de la ruptura) y la elasticidad. Sin embargo, estos ensayos han sido muy poco empleados en el análisis de productos cárnicos. Algunos autores (Purslow, 1985; Egelandssdal y col., 1996; Lepetit y Culioli, 1994; Willems y Purslow, 1996) los han utilizado para estudiar las propiedades mecánicas de fibras musculares y de las miofibrillas antes, durante y después del *rigor mortis* y para analizar el efecto de la temperatura de cocción en carne, fibras musculares aisladas y tejido conjuntivo (Lepetit y Culioli, 1994; Lewis y Purslow, 1989; Mutungi y col., 1995, 1996; Willems y Purslow, 1996; Christensen y col., 2000). Más recientemente (Christensen y col., 2003), se han aplicado para determinar los cambios de las propiedades mecánicas de las fibras musculares en el almacenamiento *post-mortem* (Farouk y col., 2005; Gillett y col., 2006). Fuera de los derivados cárnicos, los productos más ensayados bajo tracción son las pastas de panadería (Miller y Trimbo, 1970), fideos, espaguetis, *noodles* y similares (Hou y col., 1996); para estos últimos se han desarrollado distintos sistemas de ensayo. Contrariamente, en el estudio de carne y derivados no hay un acuerdo en la forma de realizar estos ensayos, y en muchos productos no hay antecedentes, lo que hace que exista riesgo de que los resultados que puedan derivarse de ensayos de tracción sean, en muchos casos, característicos de un producto particular y bajo condiciones experimentales muy concretas, siendo difícilmente repetitivos.

En esta tesis doctoral, con la aplicación del test del TPA (doble compresión) y de ensayos tracción se ha intentado incrementar el conocimiento existente sobre el comportamiento reológico de los productos cárnicos. Teniendo en cuenta que algunos materiales son especialmente resistentes a la compresión (acortamiento) mientras que otros lo son más a la tracción (alargamiento), se hipotetizó que el análisis de los derivados cárnicos con ambas fuerzas (compresión y tracción) permitiría la caracterización de los mismos de acuerdo a su comportamiento reológico. En este contexto, se ha conseguido agrupar los productos cárnicos en torno a distintos perfiles de textura. Por otra parte, considerando que en la mayor parte de los tejidos existe un paralelismo entre su comportamiento cuando se someten a compresión y el manifestado frente a la tracción, se supuso que sería posible relacionar los parámetros

obtenidos en el TPA y en los ensayos de tracción. En esta línea, utilizando el análisis de regresión múltiple, se han obtenido ecuaciones que permiten la estimación de la fuerza o resistencia a la ruptura y de la energía de fractura, a partir de parámetros derivados del TPA.

Por otra parte, para que los resultados obtenidos puedan compararse con los derivados de otras experiencias futuras, en el estudio realizado se han determinado las condiciones adecuadas para la aplicación de ensayos de tracción a distintos productos cárnicos. En este campo, se han definido, tanto la geometría y dimensiones de las muestras, como los parámetros que permiten reproducir el estado de sollicitación y las condiciones de deformación durante el ensayo. Las condiciones de ejecución de los ensayos de tracción, los perfiles de textura y las ecuaciones obtenidas se analizarán más adelante.

El ensayo de tracción ha sido considerado como el más adecuado tanto para la investigación estructural (Purslow, 1985) como para el comportamiento mecánico y reológico de los tejidos (Bourne, 2002; Honikel, 1998). La información obtenida complementa la aportada por otros ensayos más relacionados con la percepción sensorial de la textura (TPA, penetración, compresión-extrusión, corte, etc.). Cabe añadir que la relación esfuerzo/deformación (expresada en las curvas correspondientes) obtenida de la aplicación de un ensayo de tracción a un determinado material, permite analizar su comportamiento mecánico, incluyendo su deformación elástica, fluencia, deformación plástica o rotura. Estudios de esta naturaleza se han realizado en distintos tejidos biológicos (Silver, 1987; Fratzl y col., 1997; García Páez y col., 2003), aunque no se han encontrado referencias bibliográficas relacionadas con productos cárnicos.

En conjunto, se considera que de un ensayo de tracción uniaxial pueden obtenerse parámetros de gran importancia para optimizar el manejo de los derivados cárnicos. A manera de ejemplo, cabe indicar que la probabilidad de ruptura de los productos cárnicos loncheados en las líneas de corte y envasado, o durante su extracción de los envases a la hora de su consumo, podrían predecirse, en gran medida, a partir de ensayos de tracción. En esta línea, son especialmente relevantes los resultados derivados del estudio de la relación esfuerzo - deformación realizado en jamón curado para la elaboración y comercialización del producto loncheado como alimento RTE. Otra aplicación de los datos derivados del ensayo de tracción es la estimación de la

estabilidad y resistencia de productos gelificados o la determinación de la fuerza de ligazón de productos reestructurados, como se analizará más adelante.

### **V.2. ADAPTACIÓN DEL ENSAYO DE TRACCIÓN UNIAXIAL AL ANÁLISIS DE MIOSISTEMAS**

El ensayo de tracción uniaxial destructivo consiste en aplicar fuerzas normales exteriores, de igual magnitud, dirección y sentido contrario, produciéndose un esfuerzo axial, es decir perpendicular al plano sobre el que se aplica la fuerza. La carga tiende a separar dos secciones próximas y, por tanto, la deformación característica es el alargamiento en la dirección de la carga y la estricción en el centro de la pieza. En estos ensayos se estudió el comportamiento del material hasta conseguir su ruptura. Las pruebas se realizan sobre muestras normalizadas, o probetas, marcadas con trazos de referencia (en general superficies rectangulares de cierto espesor). Para la ejecución del ensayo es necesario regular la intensidad y velocidad de carga. Son precisamente estos últimos parámetros, la forma y dimensiones de la probeta y la velocidad de deformación o de ejecución del ensayo, los de mayor efecto sobre los resultados y, por tanto, es importante fijarlos con precisión para lograr la normalización de estos ensayos y la obtención de resultados repetitivos.

Una de las principales razones por las que los ensayos de tracción son poco difundidos en el análisis de productos cárnicos, y en general en alimentos, está en la dificultad de fijar los extremos de las probetas para poder aplicar la fuerza requerida. En un ensayo de tracción sólo pueden considerarse los resultados derivados de la rotura de las probetas en la zona central. Dada la escasa resistencia a la compresión de la mayoría de los productos cárnicos, la sujeción de los extremos de las probetas con suficiente firmeza como para permitir que puedan someterse a una deformación por alargamiento resulta complejo. La simple inmovilización puede inducir la ruptura y, en consecuencia, e influir en el desarrollo del ensayo de tracción, se producirá la ruptura en los extremos, sin que se manifieste la relación esfuerzo/deformación. En relación con la sujeción de materiales frágiles se han propuesto varias soluciones: muelles, placas y pegamentos, que hasta ahora no han solventado el problema para muchos alimentos. Los dos primeros sistemas tienen el inconveniente de la acumulación de esfuerzos en la zona de sujeción. La utilización de pegamento (Lewis y Purslow, 1991) sólo puede efectuarse en productos secos y con superficies regulares.

Otra dificultad de los ensayos de tracción es el carácter anisotrópico de la mayoría de los productos cárnicos y la diversidad de estructuras que presentan (matrices gelificadas, tejido adiposo, muscular, etc.). Todo ello conduce a que la respuesta a la aplicación de una fuerza de tracción sea muy variable y en muchos casos difícil de analizar o interpretar. Estas circunstancias hacen especialmente importante precisar la forma de obtención de las probetas a ensayar (geometría, dirección de las fibras musculares, dimensiones, etc.) y las condiciones de ejecución del ensayo.

Dados los escasos antecedentes, la metodología seguida en los ensayos de tracción aplicados a distintos productos cárnicos fermentados (apartado IV. Resultados, Capítulo 1, artículo 1.1) y cocidos (apartado IV. Resultados, Capítulo 1, artículos 1.2 y 1.3), jamón curado (apartado IV. Resultados, Capítulo 1, artículo 1.4) y geles de fibrinógeno-trombina y emulsiones cárnicas gelificados en frío (apartado IV. Resultados, Capítulo 3, artículo 3.3), y que se recoge en esta Tesis Doctoral, deriva de experiencias en las que se analizó el efecto de las condiciones de desarrollo de estos ensayos. Los análisis se realizaron inicialmente con muestras comerciales de chorizo y salami (como representantes del grupo de fermentados), mortadelas (como modelo de emulsión cárnica estabilizada por el calor), jamón cocido (como patrón de productos elaborados con carne a partir de porciones musculares íntegras) y jamón serrano. Seguidamente se exponen y discuten los resultados obtenidos en relación con las distintas variables del ensayo estudiadas:

**i) Sistema de fijación de las muestras.** En el presente estudio se han utilizado sistemas de sujeción comerciales habitualmente utilizados en el análisis de materiales no alimenticios (plásticos, materiales de recubrimiento, envases, etc.). En concreto, se han utilizado pinzas de tensión de cierre excéntrico A/TGT y mordaza estándar o pinzas de tensión A/MTG. En el primer caso se trata de dos rodillos con superficies dispuestas en paralelo (Figura II.1.a), ajustadas por un par de tensores. Las segundas presentan dos superficies que se desplazan mediante un tornillo central (Figura II.1.b). Ambos sistemas de pinzas están diseñados para que las muestras no resbalen. Por ello, las superficie de sujeción son rugosas, lo que unido a la compresión que ejercen, provocan, en algunos alimentos, lesiones en la superficie de la muestra (líneas de debilidad o, incluso, puntos de ruptura) que originan el fallo del ensayo. Este problema se presentó en la mayoría de los productos cárnicos fermentados y de los derivados de emulsiones cárnicas gelificadas. En estos casos, se elaboraron pequeñas fundas de papel Whatman para fortalecer los extremos de las probetas, lo que permitió solventar,

en gran medida, los problemas de fijación sin interferir en los resultados del ensayo. En los experimentos realizados con distintos productos cárnicos (fermentados y cocidos) se observó que la utilización de pinzas de cierre excéntrico A/TGT para inmovilizar los extremos de las probetas de una forma menos traumática, permitía una sujeción de las muestras acorde con el espesor de las mismas. No obstante, en productos como jamón curado, con períodos elásticos más o menos largos, el fracaso del ensayo de tracción fue frecuente al deslizarse los extremos de las probetas. Este problema no se presentó cuando se utilizaron pinzas de mordazas A/MTG. Además, la integridad de los tejidos procedentes de jamón curado no se vio afectada por la inmovilización de los extremos de las probetas por este sistema. Teniendo en cuenta estas apreciaciones, se consideró que las pinzas de cierre excéntrico A/TGT eran las más adecuadas para la ejecución del ensayo de tracción en productos cárnicos fermentados y cocidos, mientras que en productos curados, como jamón, era más conveniente el empleo de mordazas (similares a las pinzas de tensión A/MTG). Mordazas con un diseño similar a estas últimas se han utilizado para realizar ensayos de tracción en tejidos con considerable resistencia y elasticidad como tendones (Purslow y col., 1998; Gentleman y col., 2003; Christensen y col., 2006) y tejido arterial (Silver, 1987; García Páez y col., 2003), permitiendo el estudio detallado de su comportamiento mecánico.

**ii) Geometría, dimensiones y obtención de las probetas de ensayo.** En general, en el ensayo de tracción uniaxial pueden utilizarse probetas con distintas formas con sección transversal cilíndrica, cuadrada o rectangular (Babu y Jayabalan, 2009; Phrukkanon y col., 1998; Dirikolu y col., 2002; Scanlon y Long, 1995). Sin embargo, en materiales anisotrópicos, incluidos tejidos, como carne cruda o cocida (Honikel, 1998; Farouk y col., 2005; Gillett y col., 2006), se utilizan habitualmente secciones transversales rectangulares, de longitud y espesor variable. En las experiencias realizadas en esta tesis, se ensayaron probetas totalmente rectangulares y en forma de “pesa” o “doble campana”, con una reducción de su anchura en el centro de la pieza, como se muestra en la Figura V.2. Esta última forma fue recomendada por Honikel (1998) para la aplicación de ensayos de tracción en carne. Este autor considera que la sección transversal de la probeta (ancho × espesor) y la dirección de las fibras musculares (Honikel, 1998) son parámetros de importancia para realizar ensayos de tracción.

En los productos cárnicos fermentados y cocidos elaborados a partir de emulsiones cárnicas, se tomaron muestras en el centro de los productos, de forma que el eje

longitudinal de las probetas fuera paralelo al del producto, lo que permitió que la anchura de las probetas estuviera menos condicionada por el diámetro de los productos cárnicos. No obstante, en piezas como las de mini-fuet, sólo fue posible trabajar con probetas de 1 cm ancho. En todos los casos, se evitó incluir las zonas más externas del producto, que pudieran presentar acortezado o mayor grado de deshidratación y, por tanto, un comportamiento mecánico distinto. En el caso de los productos cocidos elaborados a partir de piezas integrales, dada la dificultad para reconocer la estructura muscular en muchos productos, las muestras se tomaron en la parte central de lonchas cortadas en sentido perpendicular al eje longitudinal del producto.

Las probetas de los músculos de jamón curado se cortaron en paralelo a las fibras musculares, para que la elongación de dichas fibras durante el ensayo de tracción fuese en sentido longitudinal (paralela a la fuerza aplicada). Las probetas para el ensayo de tracción deben obtenerse de cortes limpios y precisos, siendo éste uno de los puntos más críticos para la realización de estos ensayos. Cualquier imperfección en las superficies de corte de las probetas puede ser un punto de inicio de la ruptura. En la presente tesis doctoral se cuidó este aspecto para reducir la variabilidad de los resultados que suele acompañar al análisis de tracción y se confeccionaron, de acuerdo a las dimensiones establecidas, plantillas metálicas con el borde cortante.

En las experiencias realizadas con productos fermentados se observó que no era necesaria disminuir de la anchura de la zona central de las probetas (para obtener la mencionada forma de pesa), e incluso resultó contraproducente, ya que aumentaba la probabilidad de que los bordes de corte presentaran imperfecciones (zonas de debilitamiento, puntos de ruptura), interfiriendo en el desarrollo del ensayo. Este hecho se debió a la estructura granular característica de estos productos constituidos por porciones de tejido muscular y tocino, de mayor o menor tamaño, lo que dificulta enormemente el corte limpio y el moldeado de las superficies para obtener las probetas con formas complejas. Por lo tanto, en estos productos se trabajó con probetas de sección rectangular con la misma anchura en toda su longitud.

Sin considerar los problemas mencionados de sujeción, en los demás productos cárnicos estudiados (cocidos elaborados a partir de emulsiones cárnicas o de piezas íntegras y jamón curado), en los ensayos de tracción realizados con probetas totalmente rectangulares, la ruptura se produjo a lo largo de la longitud de la misma en



distintos puntos y aunque la resistencia a la ruptura no cambió significativamente ( $p > 0,05$ ), las curvas de esfuerzo-deformación presentaron perfiles muy dispares. Sin embargo, cuando se optó por la forma de pesa, la ruptura se generó en la parte central de las probetas en la mayoría de los ensayos (por ejemplo, entre el 70-80 % de las probetas de productos cocidos íntegros) y se obtuvieron curvas de esfuerzo-deformación con poca variación intra-ensayo y características de cada producto o tejido. Por tanto, y en concordancia con los resultados de Honikel (1998) en carne, las probetas en forma de pesa se consideraron más adecuadas para realizar los ensayos de tracción en los productos cárnicos cocidos y en jamón curado.

En relación con las dimensiones de las probetas, para iniciar el estudio se mantuvieron las proporciones 4/1/0,5 para largo/ancho (en el centro de la pieza cuando se utilizaron formas de pesa)/espesor, establecidas por Honikel (1998) para el análisis de carne (Figura V.3). Manteniendo estas proporciones, la longitud y la anchura de las probetas se ajustaron a las dimensiones de las pinzas de sujeción. Para todos los productos cárnicos (fermentados y cocidos), en los que se utilizaron las pinzas A/TGT, se elaboraron probetas entre 7,5 y 8 cm de longitud y 2 cm de ancho (Figura V.2). La elección de la longitud, aunque no es determinante para la ejecución del ensayo, se realizó teniendo en cuenta tanto las dimensiones de las pinzas (con dos rodillos de sujeción con un diámetro de 2 cm) como la fragilidad de la mayoría de los productos cárnicos fermentados o cocidos. Ambas condiciones requirieron trabajar con probetas relativamente grandes, fáciles de manejar y de colocar entre las pinzas de tensión. Respecto al espesor, para emular los productos comerciales loncheados, se analizaron probetas entre 0,2 y 0,3 cm. Estas probetas permitieron un adecuado desarrollo de los ensayos de tracción. Sin duda, la mejora de los sistemas de sujeción de las muestras ha permitido trabajar con probetas con un reducido espesor, respecto al recomendado por Honikel (1989). En este estrecho intervalo de valores (0,2-0,3 cm) no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) ni en el comportamiento de las probetas ni en los resultados obtenidos (resistencia a la ruptura o energía de fractura). En resumen, puede decirse que para ensayar la tracción de distintos productos cárnicos pueden utilizarse probetas de forma rectangulares (en el caso los embutidos fermentados) y de pesa (en el caso de los productos cocidos) con una proporción 4/1, longitud/anchura. El espesor puede ajustarse al que habitualmente se utiliza en el loncheado comercial de los productos cárnicos (entre 0,2 y 0,3 cm).

En el caso de jamón curado, el empleo de las pinzas A/MTG (de menor tamaño que las de cierre excéntrico) permitió trabajar con probetas con forma de pesa de 4 cm de longitud y 1 cm de ancho en la zona más estrecha. Se ensayaron probetas con espesores de 0,5 (para mantener las mencionadas proporciones definidas por Honikel), 0,3 y 0,2 cm. Al igual que en los productos cárnicos fermentados y cocidos, se pidieron realizar ensayos de tracción, sin problemas adicionales, con probetas con espesores en el intervalo de valores en el que se presentan los productos loncheados comerciales. Dado el carácter heterogéneo de la estructura de los músculos, especialmente del *semitendinosus*, con distinta presencia de grasa infiltrada, desarrollo de tejido conjuntivo y distribución de las fibras musculares en distintas secciones del mismo, se consideró conveniente trabajar con probetas pequeñas, de reducido volumen, para homogenizar el comportamiento mecánico del conjunto de la probeta. De hecho, cuando se realizaron ensayos de tracción utilizando probetas de mayor volumen (8 cm de longitud  $\times$  2 cm de ancho  $\times$  0,5 cm de espesor) se incrementó significativamente ( $p < 0,05$ ) el porcentaje de fallos por ruptura fuera de las zonas centrales y la variabilidad de los perfiles de las curvas de esfuerzo-deformación fue mayor. No obstante, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en la resistencia a la ruptura ( $\text{N cm}^{-2}$ ) obtenida utilizando probetas de mayor o menor tamaño para una determinada muestra. Los resultados obtenidos permiten recomendar la utilización de probetas en forma de pesa de 4 cm de largo  $\times$  1 cm de ancho en la parte central  $\times$  0,2 cm de espesor para realizar un análisis detallado del comportamiento mecánico de distintos tejidos de jamón curado a partir de las curvas de esfuerzo-deformación derivadas de ensayos de tracción. No obstante, para el cálculo de la resistencia a la ruptura de estos productos pueden utilizarse probetas en forma de pesa con dimensiones que mantengan las proporciones estimadas por Honikel (1998) (4/1/0,5, largo/ancho/espesor).

**iii) Parámetros de desarrollo del ensayo.** Uno de los principales parámetros de este ensayo es la velocidad de tracción o de deformación a la que se somete a las muestras. Puesto que todos los alimentos tienen un comportamiento viscoso más o menos marcado, su respuesta (esfuerzo) en cualquier ensayo está influida por la velocidad de deformación, modificándose consecuentemente las curvas de esfuerzo-deformación (Roudot, 2004). En el presente caso, se ensayaron velocidades entre 0,5  $\text{mm s}^{-1}$  y 2  $\text{mm s}^{-1}$ . Para todos los productos cárnicos estudiados la velocidad de ensayo más conveniente fue de 1  $\text{mm s}^{-1}$ , dado que permitió obtener curvas de esfuerzo-deformación en las que podía estudiarse el comportamiento mecánico del material,

apreciándose claramente los límites elásticos y de ruptura. Otros autores han utilizado valores similares para este parámetro en el estudio del comportamiento de carne y fibras musculares al aplicar fuerzas de tracción (Scanlon y Long, 1995; Dirikolu y col., 2002; Zeugolis y col., 2008). En general, cuando se aplicaron velocidades más bajas ( $0,5 \text{ mm s}^{-1}$ ) o más elevadas ( $2 \text{ mm s}^{-1}$ ) fue difícil determinar el punto de ruptura; en el primer caso por la obtención de curvas de esfuerzo-deformación con numerosos puntos de inflexión, probablemente debidos al registro de micro-rupturas progresivas, y en el segundo por obtenerse registros esfuerzo-deformación muy cortos sin que pudieran diferenciarse los puntos de fluencia de los materiales ensayados.

Para una adecuada colocación de las probetas entre las pinzas de cierre excéntrico, se fijó una distancia inicial entre ambas piezas de 1,70 cm cuando se utilizaron probetas de forma rectangular (embutidos fermentados). Esta distancia se redujo a 1,25 cm cuando se ensayaron productos cocidos utilizando probetas en forma de pesa, para que la zona sometida a tracción fuera sólo la que mostraba la reducción de sección (Figura V.2). Cuando se utilizaron las pinzas A/MTG, con probetas en forma de pesa de 4 cm de longitud y 1 cm de ancho, la separación inicial fue de 2,5 cm. Cabe indicar que cuando se emplean las pinzas de cierre excéntrico la superficie de ensayo es prácticamente el doble que la establecida entre las pinzas A/MGT, mientras que con las pinzas tipo mordaza A/MTG la distancia es equivalente a la longitud de la superficie sometida a ensayo. Por otra parte, la temperatura es otro factor con un marcado efecto sobre el comportamiento reológico de los alimentos (Roudot, 2004). En el presente estudio, la temperatura de ejecución de los ensayos fue de  $22 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , estando las muestras previamente atemperadas a la misma temperatura ( $22 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Otro de los puntos considerados para la optimización del ensayo de tracción en productos cárnicos fue la elección de la célula de carga, que actúa como sensor de la resistencia a la deformación ofrecida por el material. Este elemento no se considera en muchos de los estudios sobre las características de textura o de propiedades reológicas que se realizan en productos cárnicos. Sin embargo, y especialmente en el registro de pequeñas fuerzas ( $< 1 \text{ N cm}^{-2}$ ), como ocurre en la resistencia a la ruptura de algunos productos cárnicos, es importante utilizar unidades pequeñas de gran exactitud y sensibilidad (0,1 %). En el desarrollo de esta tesis se han utilizado células de carga de 5 y 25 kg, en relación con la resistencia a la deformación que cabía esperar en los productos analizados. El empleo de una célula de carga de 5 kg permitió el análisis de

todos los productos estudiados no obstante cuando la resistencia a la ruptura superaba los  $2,5 \text{ N cm}^{-2}$  podría utilizarse, indistintamente, una célula de 25 kg.

El ensayo de tracción uniaxial destructivo, se utilizó también para determinar la resistencia a la ruptura de geles de fibrinógeno-trombina (FT) y de emulsiones cárnicas gelificadas en frío con FT (apartado IV. Resultados, Capítulo 3, artículo 3.3), siendo necesario establecer las condiciones de realización del mismo. Weisel (2004; 2005) estudió las propiedades mecánicas de los geles de fibrina en sistemas biológicos y algunos autores (Flores y col., 2007) se han ocupado del estudio de las características de textura de productos cárnicos adicionados con FT. Sin embargo, no se encontraron referencias bibliográficas relacionadas con el estudio de propiedades reológicas de geles de FT o modelos similares. Dada la similitud de los sistemas gelificados en frío con FT con los productos cárnicos cocidos elaborados a partir de emulsiones cárnicas, se utilizaron las condiciones indicadas para estos últimos para realizar los ensayos de tracción. No obstante, las dificultades para el corte y moldeado de las probetas hicieron recomendable trabajar con un espesor de 0,5 cm., la anchura de las probetas se incrementó hasta 2,5 cm para posibilitar el ensayo en emulsiones cárnicas con distinto grado de gelificación en frío

La *fuerza de ligazón* se determinó para determinar la eficacia y viabilidad de los diferentes agentes de cohesión en frío (MTGasa y agentes del plasma sanguíneo) (apartado IV. Resultados, Capítulo 3, artículos 3.1, 3.2 y 3.3). En el campo de la elaboración de productos reestructurados, este parámetro se define como la fuerza requerida por unidad de superficie ( $\text{N cm}^{-2}$ ) para separar, directa o indirectamente, porciones cárnicas unidas (Schmidt y Trout, 1982). En el presente caso, la fuerza de ligazón se determinó en un ensayo de tracción uniaxial destructivo, en el que se utilizaron los parámetros y las condiciones de ejecución establecidos en el análisis de productos cárnicos. Las probetas fueron de las mismas dimensiones que las utilizadas en el análisis de las emulsiones cárnicas gelificadas (7 cm de longitud, 2,5 cm de ancho y 0,5 cm de espesor). Todas ellas tuvieron sección rectangular, estando la zona de ligazón ubicada en el centro de las piezas, equidistante de los extremos.

La fuerza de ligazón de productos reestructurados se ha determinado utilizando diferentes ensayos aunque en la mayoría de los trabajos realizados se ha recurrido a ensayos de compresión, normalmente utilizando sondas de punción, en los que se determina la resistencia del material a la penetración (Field y col., 1984; Jiménez-

Colmenero y col., 2003; Kim y col., 2004). En las experiencias realizadas en esta tesis se optó por el uso de un ensayo de tracción, como han hecho otros autores (Ismail-Fitry y col., 2011), al encontrarse más cercano a la sollicitación del producto durante su manipulación en las líneas de procesado e incluso durante su consumo. En el trabajo realizado, se ha intentado reproducir este ensayo de tracción en condiciones cercanas a las del análisis de productos loncheados, con el fin de favorecer la comparación de la respuesta del producto reestructurado con la de derivados cárnicos comerciales.

### **V.3. ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS DE DISTINTOS PRODUCTOS CÁRNICOS**

El análisis del comportamiento reológico de los productos cárnicos habitualmente se limita al empleo de ensayos en los que se intenta imitar el proceso de masticación. Estos métodos tienen la ventaja de su simplicidad y de aportar parámetros de textura que pueden correlacionarse con el análisis sensorial de ésta (Bourne, 2002). Estos métodos se basan en determinar la resistencia del material a la deformación producida por la aplicación de fuerzas de compresión, corte y cizalla, emulando alguna de las acciones de las piezas dentarias durante la masticación. Aunque la descripción y el análisis de los diversos métodos de esta naturaleza que pueden utilizarse están fuera de la extensión de la presente tesis doctoral, cabe indicar que en el campo de los alimentos sólidos y de los semisólidos, la mayor parte de los estudios realizados corresponden a ensayos de compresión y de penetrometría. En sólidos también es habitual recurrir a ensayos de cizalla o de corte, como los de Warner-Bratzler, en semisólidos a ensayos de torsión y en ambos (sólidos y semisólidos) a ensayos de compresión-extrusión (Bourne, 2002; Kilcast, 2004; Roudot, 2004).

Sin duda, la percepción sensorial de la deformación de los alimentos durante la masticación, incluida en el concepto de textura, juega un importante papel en la valoración global de la calidad de un alimento (Szczesniak, 1963). Sin embargo, el estudio del comportamiento reológico de los alimentos es mucho más amplio y, al igual que ocurre con los materiales no alimentarios, es importante conocerlo, en la mayor extensión posible para poder abordar múltiples aspectos como el control de la producción, la optimización de equipos, la mejoras de la comercialización, etc. En esta línea, se planteó el estudio de las propiedades reológicas de productos cárnicos comerciales fermentados (chorizo, salchichón, salamis, fuet, mini fuet) y cocidos,

mediante el TPA y un ensayo de tracción axial destructivo. No es nada fácil comparar los resultados debido a la gran dispersión de las condiciones de ensayo utilizadas. Desde las dimensiones de las probetas hasta las variables de realización del análisis, como la velocidad de ejecución o el porcentaje de compresión de las muestras, e incluso el cálculo y la forma de expresión de los parámetros determinados, varía de unos trabajos a otros. Todo ello condiciona los resultados obtenidos e imposibilita la comparación, o la aplicación, de los datos ofrecidos más allá de las experiencias de las que proceden. En esta tesis doctoral, el TPA de productos comerciales españoles, se llevó a cabo siguiendo las indicaciones de Szczesniak (1963) y las condiciones de ensayo establecidas en distintas experiencias realizadas en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la UCM, en las que se han estudiado diversos productos cárnicos (Bruna y col., 2000; Hoz y col., 2004; Mendoza y col., 2001; García y col., 2006; Soto y col., 2010), y por otros grupos de investigación (p.e., Gimeno y col., 2000; Houben y van't Hooft, 2005; Kerr y col., 2005; Muguerza y col., 2001; Mor-Mur y Yuste, 2003; Yilmaz y col., 2002; Visessanguan y col., 2004). Los parámetros derivados de las curvas esfuerzo-deformación tras una doble compresión se estimaron de acuerdo a lo indicado originalmente por Bourne (1978, 2002). En conjunto, se ha intentado ofrecer resultados normalizados, de sencilla repetitividad.

Teniendo en cuenta las recomendaciones para la correlación de los resultados del TPA y los derivados de un panel sensorial (Szczesniak, 1963), las muestras inicialmente se comprimieron hasta un 75%. Sin embargo, este nivel de compresión ocasionó en algunos productos cárnicos (por ejemplo en algunas galantinas y salamis) su total disgregación en el primer ciclo de deformación. Esto hizo que se optara por una compresión al 50%, que permitió calcular los distintos parámetros en todos los productos, ya que produjo la deformación de los mismos sin llegar a su ruptura total. Niveles más bajos de compresión (por ejemplo del 35 %) llevaron a una deformación insuficiente de la mayoría de las muestras y a la imposibilidad de calcular algunos parámetros.

En el desarrollo de este apartado de la tesis doctoral se han estudiado embutidos fermentados (chorizo, salchichón, salami, fuet y mini-fuet), productos cárnicos cocidos obtenidos de emulsiones cárnicas estabilizadas por el calor (chóped, mortadela, galantinas y fiambre) o elaborados a partir de porciones cárnicas íntegras (pechugas, paletas, pernils), todos ellos adquiridos en distintos establecimientos comerciales. En el caso de los productos fermentados se analizaron 30 tipos de muestras,

caracterizadas fundamentalmente por su proceso de elaboración, denominación, ingredientes, calibre, contenido de grasa,  $a_w$  y pH. De acuerdo con la clasificación de embutidos propuesta por Roca e Incze (1990), todos los productos analizados eran adecuados para ser loncheados. Entre ellos se encontraban: 9 marcas comerciales de chorizo, 7 de salchichón, 5 de salami, 5 de fuet y 4 de mini-fuet. En el estudio de los productos cocidos elaborados a partir de pasta fina se consideraron un total de 24 tipos elaborados con carne de porcino (blanco e ibérico), pavo, pollo y pato, incluyendo: 9 marcas de mortadela, 8 de chóped y 7 de galantinas. Respecto a los productos cocidos procedentes de estructuras musculares íntegras, se analizaron un total de 14 tipos, de los cuales 8 tenían origen porcino y 6 procedían de carne de ave. En conjunto, se han analizado un total de 68 productos cárnicos, lo que se considera un número de muestras representativo de la oferta comercial actual de este tipo de alimentos, así como un marco adecuado para el estudio de la diversidad de las propiedades reológicas y de su posible relación con características estructurales (granulometría de la grasa, proporción de matriz cárnica gelificada, etc.) y físico-químicas (pH,  $a_w$ , contenido en extracto seco y grasa). Seguidamente, se analizan aspectos generales de cada uno de los productos cárnicos estudiados y finalmente se acomete un estudio global de su comportamiento reológico.

Los embutidos fermentados constituyen un amplio grupo de derivados cárnicos. Brevemente puede decirse que están elaborados a partir de carne (generalmente de porcino, con o sin vacuno), tocino (con distinto grado de reducción de tamaño) y de ingredientes no cárnicos (pimentón y ajo o pimienta y otras especias y condimentos), dependiendo del tipo de producto que se embuten en tripas naturales o artificiales. Para su obtención se requiere un proceso fermentativo conducido por microorganismos, en el que se produce un descenso del pH y una etapa de maduración y curado, en la que la  $a_w$  se reduce y se desarrollan el aroma y textura característicos del producto, como consecuencia de numerosos procesos químicos y enzimáticos (Ordóñez y Hoz, 2001; Frey, 1983). La reducción de la  $a_w$ , en combinación con el descenso del pH, inhibe la microbiota patógena y proporciona estabilidad al producto. La consistencia de estos productos cárnicos se debe básicamente a la gelificación de la matriz proteica, por el descenso del pH y la consiguiente desnaturalización del componente proteico, favoreciéndose las interacciones intramoleculares. En este grupo de derivados cárnicos (BOE, 1980) se encuentran productos característicos elaborados con pimienta (negra y/o blanca) y sin pimentón, como salchichones (con un diámetro

final mayor de 22 mm), fuet (con un diámetro final inferior a 40 mm), mini-fuet (con calibre máximo de 20 mm), salami (caracterizado por un picado de grasa y carne inferior a 3 mm), así como otros elaborados con pimentón, como diversos tipos de chorizo, con distintas denominaciones dependiendo del diámetro final (chorizo [calibre igual o superior a 40 mm], chorizo o longaniza [entre 40 y 22 mm] y longaniza [menor de 22 mm]).

Los productos de este grupo estudiados (apartado IV. Resultados, Capítulo 1, artículo 1.1) presentaron diámetros y características físico-químicas dentro de los márgenes propios de este tipo de derivados cárnicos (BOE, 1980; Kröckel, 1995; Novelli y col., 1998; Ordóñez y Hoz, 2001; Zanardi y col., 2000). De acuerdo con la clasificación de embutidos fermentados de Lücke (1988), todos ellos estuvieron dentro de los considerados secos ( $a_w < 0,9$  con un tiempo de curado superior a 4 semanas), con y sin crecimiento de mohos en la superficie, sin que a este factor o al tipo de producto pudieran asociarse diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) de las características físico-químicas ( $a_w$ , contenido en extracto seco y grasa), con la excepción del fuet y mini-fuet. Estos últimos fueron los productos con mayor contenido en extracto seco y menor  $a_w$  (mini-fuet) y contenido de grasa ( $p < 0,05$ ).

Respecto al pH, se encontraron productos con valores dentro de los calificados de baja acidez (pH  $> 5,5$ ), de acidez media (pH entre 5 y 5,5) y de acidez alta (pH  $< 5$ ). Es sabido que esta clasificación de los productos fermentados deriva de las diferencias en la formulación utilizada y de diversos factores como el tipo y la cantidad de carne, grasa, azúcar, cultivo iniciador, etc. (Ibáñez y col., 1996) y del proceso de maduración (Liepe y col., 1990). En consecuencia, este parámetro fue el único que marcó diferencias ( $p < 0,05$ ) entre los distintos tipos de productos estudiados. Como era de esperar, dada las características del fuet y del mini-fuet (Ripoll, 1992), estos mostraron los valores más altos de pH mientras que las muestras de salami presentaron, en general, los más bajos. En el análisis conjunto se observó que el 70 % de las muestras comerciales presentaba una acidez media y alta. Este tipo de embutidos es el más demandado en el mercado actual.

Tanto en los productos elaborados con pimienta (fuet, salchichón y salami) como en los que presentaban pimentón y ajo (chorizo), la grasa fue el componente más variable, con valores que oscilaron entre un 20 y un 70 % del extracto seco en chorizo, salchichón y salami. Esta dispersión es característica de este tipo de productos, dada su



considerable tolerancia para incorporar grasa, generalmente en porciones (con tamaño más o menos reducido) que aportan el aspecto particular a cada uno de ellos (Lois y col., 1987; Ordóñez y Hoz, 2001). El contenido en grasa y la granulometría de la misma tuvieron, como seguidamente se analizará, un papel esencial en el comportamiento reológico del producto.

En general, los productos fermentados mostraron fuerzas de rotura muy dispares, oscilando entre 0,7 y 11 N cm<sup>-2</sup>, siendo las muestras de chorizo y salchichón las que ofrecieron menor resistencia. La dureza fue superior a 100 N en un 60 % de estos productos, mientras que, en más del 50 % de los casos, la adhesividad osciló entre 0,6 y 1,3 N s y la masticabilidad entre 0,15 y 0,40 J. La elasticidad (0,4 - 0,61 × 10<sup>-2</sup> m) y la cohesividad (0,40 - 0,45) fueron los parámetros que mostraron menos variación. Que la autora sepa, no existen trabajos relativos a la aplicación de ensayos de tracción a embutidos fermentados. Sin embargo, los parámetros del TPA se encontraron en el intervalo de valores dados por otros autores para productos similares (Bruna y col., 2000; Gimeno y col., 2000; Herranz y col., 2005; Muguerza y col., 2003).

Dada la gran diversidad de productos cárnicos tratados por el calor existente en el mercado, para su estudio se optó agruparlos de acuerdo a su estructura. De esta forma, se consideraron dos grupos: los procedentes de emulsiones cárnicas estabilizadas por el calor y aquellos elaborados a partir de porciones de carne íntegra, en mayor o menor grado. Los primeros se obtienen a partir de los constituyentes de la carne (pollo, pavo, pato, cerdo blanco, cerdo ibérico y ternera) finamente divididos (en una *cutter* o molino coloidal) hasta la obtención de una pasta fina. Esta última, mezclada con sal y agua, se comporta como una emulsión de grasa en agua, donde la fase dispersa es la grasa y la fase continua está formada por una disolución acuosa de sales y proteínas. En esta emulsión cárnica las proteínas miofibrilares son las que presentan la capacidad emulsionante. A la emulsión cárnica o matriz proteica pueden adicionarse y mezclarse colorantes, especias y distintos condimentos, además de carne y grasa picados o troceados o diversos ingredientes (frutos secos, aceitunas, etc.). En el proceso final, el conjunto se somete a un tratamiento térmico, con dos objetivos, uno tecnológico: producir la gelificación o coagulación de la matriz proteica y conseguir la textura, sabor, color y aroma, que caracterizan al producto y otro higienizante con el fin de eliminar la microbiota patógena. Entre los productos de esta naturaleza pueden citarse a la mortadela y el chópéd (BOE, 1981). Cuando en su composición se incluye carne de ave se denominan galantinas.

Dentro de estos derivados cárnicos, se estudió (apartado IV. Resultados, Capítulo 1, artículo 1.2) un grupo diverso de productos, con distinta morfología, representativo del amplio abanico ofertado en el mercado (Bardón y col., 2012). Las variaciones detectadas en las características físico-químicas ( $a_w$ , pH, contenido de graso y de extracto seco) se han atribuido a diferencias en la formulación y no al tipo de producto (mortadela, chópéd o galantina). En general, los datos obtenidos estuvieron en el intervalo de los ofrecidos por otros autores (Mielnik y col., 2002; Yilmaz y col., 2002; Bardón y col., 2012) para derivados cárnicos similares. Como se observó en los embutidos fermentados, las mayores variaciones detectadas estuvieron en torno al contenido de grasa, que osciló entre el 19 y el 50 % del extracto seco. Teniendo en cuenta este factor, los productos estudiados se agruparon en tres categorías: bajos en grasa (< 25% del extracto seco) y con un contenido medio (25-35 %) o alto (> 35 %). Casi el 60 % de los productos comerciales estuvieron en esta última categoría (prácticamente todas las mortadelas y la mitad de las muestras de chópéd), mientras que sólo el 8 % fueron bajos en grasa. En general, las galantinas presentaron menor contenido en grasa, coincidiendo con las apreciaciones de otros autores (Mielnik y col., 2002; Yilmaz y col., 2002). También hubo similitud con anteriores estudios de derivados cárnicos cocidos similares (Cáceres y col., 2008) en el intervalo de valores de pH (6,6 y 7,0) y  $a_w$  (0,95 y 0,98).

En el análisis de las características reológicas se observó que algunos productos, como las galantinas, presentaban una escasa resistencia a la ruptura (0,03 N cm<sup>-2</sup>), prácticamente en el límite de detección del analizador de textura utilizado. Para tener más información del comportamiento mecánico de los productos cocidos también se determinó la energía de fractura (Honikel, 1998). El 50 % de los productos cocidos presentaron una resistencia a la fractura entre 1 y 3 N cm<sup>-2</sup>, mientras que la energía de fractura osciló en un amplio intervalo de valores, desde 4 hasta 12 N mm. Las muestras de mortadela, en general, fueron las que requirieron mayor energía de fractura, lo que indicaría una mayor capacidad de deformación antes de su ruptura. Este hecho estaría refrendado por los mayores valores de elasticidad de las mismas muestras (entre 0,62 y 0,67 × 10<sup>-2</sup> m). Los parámetros del TPA, aunque con importantes variaciones de unas muestras a otras, pueden considerarse en el intervalo de valores hallados por otros autores en productos cocidos similares (Cáceres y col., 2008; García y col., 2007; García y col., 2006; Kerr y col., 2005; Mor-Mur y Yuste, 2003; Yilmaz y col., 2002). Cabe indicar que alrededor del 60 % de los productos presentaron una dureza inferior a 50 N. Estos

productos presentaron una considerable variabilidad de la adhesividad (desde -0,02 hasta -1,08 N mm), mientras que la elasticidad fue, al igual que en el caso de los embutidos fermentados, el parámetro más homogéneo (de 0,45 a  $0,65 \times 10^{-2}$  m).

Los productos cárnicos cocidos elaborados a partir de estructuras musculares íntegras se elaboran a partir de materias primas seleccionadas que presentan un pH en torno de 5,8, adecuado para conseguir una buena capacidad de retención de agua (CRA), y desprovistas de grasa y tejido conjuntivo para obtener una buena cohesión en el interior de la pieza (Ordóñez y col., 1998). En algunas ocasiones se puede adicionar ciertos ingredientes, como almidón, fécula y distintos espesantes, y son entonces denominados fiambres (BOE, 1984). El tratamiento térmico es suficiente para lograr la coagulación de las proteínas cárnicas. Dentro de este grupo se encuentran productos de origen porcino, denominados según la pieza anatómica de procedencia e ingredientes, tales como jamón cocido y fiambre de jamón, paleta cocida y fiambre de paleta, magro de cerdo cocido y fiambre de magro (BOE, 1984). Durante el proceso de fabricación, cualquier de ellos, puede salmuerizarse, ahumarse, hornearse, tratarse con especias, recubrirse con gelificantes o envasarse con líquidos de gobierno (BOE, 1984). Por otra parte, también se elaboran productos característicos de carne de ave, entre los que cabe destacar pechuga y jamón de pollo o de pavo y, con menos frecuencia de pato, y fiambres de pechuga de distinto origen (Bardón y col., 2012).

En representación de los productos comerciales de esta naturaleza, se han estudiado distintos jamones cocidos y fiambres de origen porcino y productos elaborados a partir de pechuga cocida y fiambres de carne de ave. El contenido en extracto seco de estos productos estuvo comprendido entre el 21 y 30 % y el de grasa entre el 5 y 30 %. Otros autores han indicado valores similares para este tipo de productos, tanto para materia seca (Desmond y Kemi, 2005; Cheng y col., 2005; Vermeiren y col., 2006; Válkova y col., 2007) como para grasa (Desmond y col., 2000; Santos y col., 2004). En general, los productos de carne de ave presentaron porcentajes más bajos de grasa que los de origen porcino. Los productos comerciales presentaron valores de  $a_w$  (0,97-0,99) y pH (6,09-6,75) dentro de los márgenes indicados para este tipo de derivados cárnicos (Vermeiren y col., 2006). Al igual que en otros productos cárnicos, hubo gran similitud en los valores de elasticidad ( $0,5 - 0,7 \times 10^{-2}$  m) y cohesividad (0,30 – 0,48) de las distintas muestras. Alrededor del 60 % de los productos comerciales rompieron con una fuerza superior a 2 N cm<sup>-2</sup>. En general, este parámetro presentó menor variabilidad que la obtenida en los embutidos fermentados

y emulsiones cárnicas gelificadas por el calor, sin duda debido a la mayor heterogeneidad de las matrices.

En conjunto, y como se ha indicado, todos los productos cárnicos estudiados presentaron una considerable dispersión de los valores en la mayoría de las propiedades reológicas determinadas, y ningún producto (embutidos fermentados y productos cocidos) pudo asociarse íntegramente a unas determinadas características. Estos hechos, sin duda se deben a la diversidad con la que cualquiera de ellos se presenta en el mercado (grado de reducción de tamaño de las porciones grasas, porcentaje de emulsión cárnica gelificada, cantidad y tamaño de las porciones cárnicas incluidas en el gel cárnico, etc.). Las modificaciones de las condiciones de elaboración y procesado afectan a las características físico-químicas y estructurales del producto y, consecuentemente, a su comportamiento mecánico y reológico. Otros autores (Ruusunen y Puolanne, 2005) hacen referencia al efecto de los cambios del proceso de elaboración en la calidad de los productos cárnicos y, en particular, en los atributos de textura. Para facilitar el análisis del efecto de las características físico-químicas y estructurales en las propiedades reológicas de los derivados cárnicos se recurrió al análisis de correlación lineal simple y múltiple.

En el caso de embutidos fermentados, se establecieron correlaciones significativas ( $p < 0,05$ ) entre distintos atributos, tales como  $a_w$ , pH y contenido de extracto seco, con la resistencia a la ruptura (se redujo con el descenso de la  $a_w$  y el pH), elasticidad (se incrementó con el descenso del contenido de extracto seco), adhesividad (se incrementó al aumentar el pH y reducirse el contenido de extracto seco) y cohesividad (se redujo con el incremento del extracto seco). En un análisis global, los resultados obtenidos parecen indicar que los productos con mayor pH presentaron mayor adhesividad, unida a una mayor resistencia a la ruptura. El incremento del extracto seco, asociado al proceso de deshidratación del producto, hizo que éste fuera menos elástico, cohesivo y adhesivo, lo que se ha interpretado como un comportamiento más quebradizo. Por el contrario, los productos con mayor  $a_w$  presentaron mayor resistencia a la ruptura. Estos resultados coinciden, en gran medida, con las indicaciones de otros autores (Buckenhüskes, 1993; Fey, 1983; Ordóñez y Hoz, 2004) en relación con el papel de la reducción del pH y  $a_w$  así como del secado (incremento del extracto seco) en el desarrollo de la textura de los productos fermentados.

Con el fin de facilitar el estudio del efecto de la morfología y características estructurales en los parámetros del TPA y en la resistencia a la ruptura, los embutidos fermentados comerciales se agruparon en cuatro categorías considerando el tamaño de sus partículas de grasa. En la primera categoría (con partículas inferiores a 0,50 cm) se agruparon todas las muestras de salami, en la segunda (con partículas entre 0,51 – 0,80 cm) las de fuet y mini-fuet, mientras que en la tercera (con partículas entre 0,81 y 1 cm) se localizaron la mayoría de las muestras de salchichón y en la cuarta (partículas mayores de 1 cm) se integraron la mayoría de las de chorizo. Con este procedimiento se apreció que ciertos parámetros, como la adhesividad y la dureza, se incrementaban con el aumento del tamaño de las partículas de grasa, mientras que la resistencia a la ruptura se reducía ( $p < 0,05$ ). Estos resultados parecen indicar que la presencia de tejido adiposo (tocino) incrementa la resistencia de los productos a la compresión pero los hace más frágiles a la solicitación por tracción, probablemente debido a su limitada interacción con la matriz proteica gelificada en su entorno. Por otra parte, la adhesividad de estos productos puede relacionarse con la presencia y el tamaño de las porciones de grasa.

Para realizar el estudio del efecto de las características estructurales en el comportamiento reológico en productos cocidos elaborados a partir de emulsiones cárnicas se llevó a cabo inicialmente un análisis de su aspecto visual en al menos 10 lonchas de cada producto, cortadas en sentido transversal. En este primer estudio se determinó el porcentaje de emulsión cárnica, se midieron las dimensiones (largo y ancho) de los elementos atrapados en la misma (trozos de carne, trozos de grasa, aceitunas, *kamaboko*, etc.) y se describieron las características de la matriz proteica y de las porciones incluidas. Por otra parte, para determinar la estabilidad de la matriz proteica gelificada por el calor y el grado de interacción con las porciones incluidas en este tipo de productos se realizó una prueba de plegado (Suzuki, 1981). En general, la relación matriz proteica–tamaño y cantidad de elementos incluidos tuvo un importante papel en la estabilidad del producto al someterse a distintas fuerzas (compresión y tracción). La resistencia a la ruptura, la energía de fractura así como la dureza y cohesividad de este tipo de productos cárnicos estuvieron significativamente ( $p < 0,05$ ) afectados por el contenido en extracto seco, grasa y  $a_w$ , aunque el efecto fue distinto al descrito anteriormente en los embutidos fermentados. En general, y contrariamente a lo que cabría esperar, los productos con mayor contenido en grasa fueron más resistentes a la aplicación de fuerzas de tracción (mayor resistencia y energía de

fractura) y de compresión (mayor dureza y cohesividad). Sin embargo, el incremento del contenido en extracto seco produjo el efecto contrario. Este hecho se ha atribuido a que el mayor contenido de extracto seco se debió al aumento (en número y/o en tamaño) de elementos sólidos (generalmente trozos de carne) atrapados por la matriz cárnica y, por tanto, los productos con mayor extracto seco y menos grasa (por tener menor contenido en emulsión cárnica) fueron, normalmente, los que presentaron menor relación matriz cárnica-elementos sólidos. Esto redujo su estabilidad, como pudo apreciarse en las pruebas de plegado (también inversamente correlacionadas con el contenido en extracto seco).

Para analizar el efecto de las características estructurales en los productos cárnicos elaborados a partir de piezas enteras se realizó una caracterización de los mismos, teniendo en cuenta el origen de la carne (porcino, pollo, pavo), calidad y denominación comercial (extra, magro, fiambre, etc.) y pieza cárnica (pechuga, pavo, jamón, etc.). En general, no hubo un comportamiento reológico asociado a un tipo de producto, ni a su origen. Al igual que en los productos anteriores, se observó que la dureza, la adhesividad, la elasticidad y la resistencia y la energía de rotura estaban correlacionadas con el contenido en extracto seco, grasa,  $a_w$  y pH. No obstante, sólo la grasa lo estuvo con todos los parámetros indicados. Al contrario que en los productos elaborados a partir de emulsiones cárnicas, en los obtenidos de piezas íntegras la resistencia a la ruptura se redujo ( $p < 0,05$ ) en los obtenidos de piezas íntegras con un incremento del contenido en grasa. Esta distinta correlación del contenido de grasa y la resistencia a la ruptura en ambos tipos de productos cocidos puede atribuirse a que, en el caso de mortadelas, chóped y productos similares, la grasa se encuentra emulsionada con la matriz proteica y su presencia se asocia a mayor porcentaje de esta última estructura, que como anteriormente se ha mencionado, daría estabilidad al producto. Sin embargo, en el caso de los productos elaborados con piezas enteras, la grasa estaría asociada a las estructuras musculares, o localizada entre las porciones cárnicas, reduciéndose en ambos casos la integridad del producto. También se obtuvo una correlación negativa al relacionar la energía de fractura y la elasticidad con el contenido de grasa. Este hecho parece indicar que la presencia de ese componente hace al producto menos elástico y su ruptura se produciría con una reducida deformación, lo que explicaría la generación de curvas de esfuerzo-deformación por tracción cortas, con escaso desarrollo de área (reducida energía de fractura). La adhesividad determinada en el TPA se redujo con el incremento del contenido en grasa,

probablemente debido a que, en este tipo de productos, este parámetro está relacionado con el agua liberada en la superficie del producto por el componente proteico.

Para definir los perfiles de textura de los distintos productos cárnicos comerciales se realizó un análisis de componentes principales utilizando como criterio de asociación las características reológicas. El perfil de textura quedó definido por los valores medios de cada parámetro reológico de los productos incluidos en cada cluster o grupo. Con este proceder se definieron cuatro perfiles (arbitrariamente denominados A, B, C y D) en el caso de los embutidos fermentados, tres (1, 2 y 3) en los productos cocidos elaborados a partir de emulsiones cárnicas y dos (I y II) en los productos cocidos elaborados a partir de piezas cárnicas íntegras. La Tabla V.1 muestra los valores medios característicos de estos nueve perfiles de textura relacionados con los distintos productos cárnicos.

	Dureza (N)	Adhesividad $\times 10^{-1}$ (N s)	Cohesividad 10	Elasticidad $\times 10^{-2}$ (m)	Resistencia a la ruptura (N cm <sup>-2</sup> )
<b>Productos embutidos fermentados</b>					
Perfil A	80 $\pm$ 28 b	3,4 $\pm$ 2,0 c,d	3,7 $\pm$ 1,0 b	0,42 $\pm$ 0,09 c	10,2 $\pm$ 4,5 a
Perfil B	170 $\pm$ 15 a	11,1 $\pm$ 3,3 b	3,9 $\pm$ 0,7 b	0,56 $\pm$ 0,07 b	11,4 $\pm$ 4,9 a
Perfil C	130 $\pm$ 23 b	6,6 $\pm$ 4,2 c	4,0 $\pm$ 0,8 a,b	0,47 $\pm$ 0,15 c	2,1 $\pm$ 1,4 c
Perfil D	120 $\pm$ 31 b	15,7 $\pm$ 0,7 a	4,4 $\pm$ 0,8 a	0,47 $\pm$ 0,10 c	4,0 $\pm$ 1,2 b
<b>Productos embutidos cocidos</b>					
Perfil 1	38 $\pm$ 13 d	1 $\pm$ 0,8 e	2,9 $\pm$ 0,8 c	0,50 $\pm$ 0,08 b	1 $\pm$ 0,80 d
Perfil 2	40 $\pm$ 2 d	2,9 $\pm$ 1,9 d	3,9 $\pm$ 0,3 b	0,61 $\pm$ 0,07 a	1,2 $\pm$ 0,36 d
Perfil 3	56 $\pm$ 13 c	6,2 $\pm$ 2,9 c	4,1 $\pm$ 0,7 a,b	0,61 $\pm$ 0,05 a	3,2 $\pm$ 0,9 b,c
<b>Productos cocidos piezas íntegras</b>					
Perfil I	51 $\pm$ 12 c	0,9 $\pm$ 0,5 e	4,4 $\pm$ 0,7 a	0,63 $\pm$ 0,04 a	2,5 $\pm$ 0,8 c
Perfil II	63 $\pm$ 14 c	2,4 $\pm$ 1,5 d	4,4 $\pm$ 0,4 a	0,57 $\pm$ 0,04 b	0,6 $\pm$ 0,4 d

**Tabla V.1.** Valores medios que caracterizan los perfiles de textura obtenidos para los distintos grupos de productos comerciales analizados.

Valores medios con diferente letra dentro de la misma columna difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

Los perfiles de textura de los embutidos fermentados se diferenciaron ( $p < 0,05$ ) fundamentalmente por la resistencia a la rotura y la adhesividad. El perfil de textura A, se caracterizó por una elevada resistencia a la ruptura (en torno a 10 N cm<sup>-2</sup>) y una baja adhesividad (alrededor de  $3 \times 10^{-1}$  N s). Los embutidos con este perfil presentaron ( $p < 0,05$ ) altos valores de pH y elevado contenido de extracto seco, mientras que el contenido de grasa y la  $a_w$  fueron significativamente los más bajos. Este perfil se encuentra ejemplarizado por el mini-fuet. El perfil B se caracterizó por los valores más altos de resistencia a la ruptura (alrededor 11 N cm<sup>-2</sup>) y una elevada adhesividad

(valores medios de  $11 \times 10^{-1}$  N s), dureza (valores próximos a 170 N) y elasticidad (en torno a  $56 \times 10^{-2}$  m). Los productos con este perfil de textura presentaron altos valores de  $a_w$  y acidez intermedia. Todos los embutidos fermentados (chorizo, salami, salchichones, fuet) estudiados presentaron productos con este comportamiento reológico. El perfil C estuvo definido por valores bajos de resistencia a la ruptura (valores medios de 2 N cm<sup>2</sup>) e intermedios-altos de adhesividad (alrededor de  $7 \times 10^{-1}$  N s). Este comportamiento se asoció a productos, como ciertos chorizos y salchichones comerciales, con elevado contenido en grasa y alto valor de  $a_w$  así como de alta-media acidez (pH 4,8-5,2). En general, los productos agrupados en este perfil fueron chorizos con el mayor tamaño en la granulometría de la grasa (partículas > 1 cm) lo que podría explicar su reducida resistencia a la ruptura. El perfil D mostró baja resistencia a la ruptura (valores medios de 4 N cm<sup>2</sup>) y los valores más elevados de adhesividad (alrededor de  $16 \times 10^{-1}$  N s). En este perfil se agruparon fundamentalmente las muestras de salami de alta acidez (pH < 5). En general, los resultados obtenidos parecen indicar que el perfil de textura A corresponde a las características de mini-fuet, el B agrupa a las muestras de fuet y el D representa, fundamentalmente, el comportamiento reológico de salamis (80 %). Los salchichones y chorizos comerciales se agrupan, en más de la mitad de los casos (55 %), en el perfil C, aunque la oferta de estos productos en el mercado es bastante heterogénea y algunas marcas mostraron el comportamiento característico de los otros perfiles de textura (B y D).

A diferencia de los embutidos fermentados, los perfiles de textura de los productos cocidos elaborados a partir de emulsiones cárnicas se caracterizaron fundamentalmente por diferencias ( $p < 0,05$ ) en la resistencia a la ruptura, dureza, adhesividad y cohesividad. El perfil de textura 1 correspondió a los productos con los parámetros de resistencia a la ruptura y de TPA (dureza, adhesividad y cohesividad) más bajos, mientras que el perfil 3 estuvo determinado por los valores más altos. El perfil de textura 2 se asoció a comportamientos intermedios (similares valores de resistencia a la ruptura y dureza que el perfil 1 y cohesividad análoga al perfil 3 y valores intermedios de adhesividad). El perfil de textura 1 agrupó a los productos constituidos por una emulsión cárnica gelificada que incluía grandes piezas de carne y otros materiales, con una escasa relación matriz-porción sólida, lo que explicaría su pequeña resistencia. En este perfil se incluyeron el 46 % de los productos cocidos, correspondiendo al 71 % de las galantinas. Sin embargo, las muestras incluidas en el perfil de textura 3 fueron los productos que presentaron una matriz proteica con



escasa presencia de elementos incluidos y bien relacionados con la misma. En la prueba de plegado estos productos no presentaron ninguna grieta cuando se plegaron en cuadrantes (grado 5), poniendo de manifiesto la resistencia y cohesión de estas matrices cárnicas gelificadas, contrariamente a lo que ocurrió con los productos incluidos en el perfil 1, que rompieron en el primer plegado. En el perfil de textura 3 se agruparon el 37 % de los productos estudiados, incluyendo el 67 % de las mortadelas. Los distintos tipos de chópéd presentaron comportamientos incluidos en el perfil 1 y 3. El perfil de textura intermedio, o 2, agrupó a productos constituidos por una matriz proteica gelificada englobando distintos materiales, como *kamaboko* o aceitunas o cubos de grasa escasamente relacionados con la matriz. En la prueba de plegado, estos productos no presentaron grietas cuando se doblaron a la mitad (grado 4), sin embargo hubo desprendimiento de los elementos sólidos incluidos, lo que produjo el debilitamiento de la estructura del material. Estos resultados avalan lo ya comentado respecto a que la matriz proteica proporciona estabilidad al producto (resistencia a la ruptura, dureza y cohesividad), mientras que la incorporación de elementos ajenos a la carne o trozos de carne de gran tamaño reduce el valor de estos parámetros. Muy probablemente, esto se debió a que, dependiendo del tamaño y cantidad de porciones cárnicas incluidas en la matriz proteica, aproximadamente el 60 % de las muestras de chópéd se incluyeran en el perfil 1 y el resto se encontrara en el perfil 3.

Diversos autores (Berry y col., 1987; Hunt y Kropf, 1987; Mandigo, 1988; Boles y Shand, 1998; Berry y col., 1999) han estudiado el efecto de la forma y tamaño de las partículas de carne en la textura de distintos productos con resultados dispares. En general, cuanto menor sea el tamaño de las partículas cárnicas mayor será la superficie expuesta y las posibilidades de interaccionar con la matriz que las rodea, proporcionando productos más estables (Campbell y Mandigo, 1978; Mandigo, 1988).

Los dos perfiles de textura obtenidos para los productos cocidos se caracterizaron ( $p < 0,05$ ), al igual que los embutidos fermentados, por la resistencia a la ruptura y la adhesividad. El perfil de textura I agrupó los productos con elevada resistencia a la ruptura y baja adhesividad, que fueron los de menor contenido en grasa y pH más elevado. El perfil de textura II fue el opuesto, es decir, baja resistencia a la ruptura y elevada adhesividad. Este perfil reflejó el comportamiento de los productos con mayor contenido en grasa y pH más bajos y, generalmente, con valores más bajos de elasticidad. Al igual que en los productos anteriores estos resultados reflejan la elevada relación entre el contenido en grasa y la textura de los productos cárnicos.

Consideraciones similares han sido descritas por diversos autores para distintos productos cárnicos cocidos (Rust y Olson 1988; Giese, 1996; Jiménez-Colmenero, 2000). Al perfil de textura I se asociaron productos de cerdo, como jamón cocido normal y de calidad extra, con y sin fosfatos, y dos tipos de productos de ave, jamón y pechuga de pavo. En el perfil II se incluyeron productos de procedencia y denominación variada.

En un análisis conjunto de los perfiles de textura de los tres tipos de productos comerciales estudiados (Tabla V.1) puede decirse que la dureza, la resistencia a la ruptura y la adhesividad fueron los parámetros que mostraron mayores diferencias, mientras que la elasticidad fue la característica más homogénea. En general, los productos cocidos elaborados a partir de porciones cárnicas íntegras (perfiles I y II) presentaron menos adhesividad y los elaborados a partir de emulsiones cárnicas de ave (perfil 1) tuvieron menos dureza y resistencia a la ruptura. Los productos fermentados estudiados, dado su nivel de curado, presentaron alta dureza y resistencia a la ruptura, especialmente en el caso del fuet y mini-fuet (perfiles A y B).

En cada uno de los trabajos (apartado IV. Resultados, Capítulo 1, artículos 1.1, 1.2 y 1.3) en los que se analizaron las características reológicas de los productos cárnicos (fermentados y cocidos) se llevó a cabo un estudio de correlación lineal múltiple para establecer la posible relación entre los parámetros determinados en el TPA y en el ensayo de tracción. Cabe destacar que, en todos los productos, se obtuvieron modelos de regresión significativos ( $p < 0,05$ ) para la estimación de la resistencia a la ruptura a partir de los parámetros del TPA. En el caso de los embutidos fermentados se obtuvo un modelo de regresión para la estimación de la resistencia a la ruptura en el que todos los parámetros del TPA tuvieron un peso similar para su determinación (de acuerdo con la significancia de los distintos valores  $t$  de Student). Este modelo presentó un coeficiente de determinación ( $R^2 = 0,63$ ) significativo ( $p < 0,0001$ ), aunque con un valor ligeramente inferior a los obtenidos para los productos cocidos. Para estos últimos, se obtuvieron valores de coeficiente de determinación de 0,75 ( $p < 0,0001$ ) y 0,69 ( $p < 0,0001$ ) para los elaborados a partir de emulsiones cárnicas y porciones cárnicas íntegras, respectivamente.

En el caso de los productos cocidos elaborados a partir de emulsiones cárnicas se realizó un tratamiento de datos más extenso, obteniéndose modelos de correlación múltiple para cada tipo de producto (chóped, mortadela y galantinas), para los dos

parámetros del ensayo de tracción considerados (resistencia a la ruptura y energía de fractura). Cabe destacar que se han obtenido modelos de predicción de la resistencia a la ruptura a partir de los parámetros de TPA con coeficientes de determinación (entre 0,94 y 0,73) elevados y significativos ( $p < 0,05$ ) para cada producto aunque no todos los parámetros del TPA tuvieron un efecto significativo ( $p > 0,05$ ) en ese modelo. Sin embargo, el modelo más sólido (elevado coeficiente de determinación, elevada significancia, con valores  $t$  de Student significativos para los distintos parámetros del TPA) fue el obtenido con todos los valores, independientemente del producto considerado. Este modelo permitiría predecir el valor del ensayo de tracción a partir de uno de los parámetros del TPA para cualquiera de estos productos cocidos. Este hecho se debe muy probablemente a la variabilidad ofrecida por todos los tipos de productos cocidos, no existiendo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en su comportamiento reológico. Por tanto, la variabilidad del parámetro a predecir quedaría mejor explicada por la diversidad de todos los datos incluidos en el análisis de correlación.

En la estimación de la energía de fractura a partir de los parámetros de TPA sólo se obtuvieron modelos de correlación con valores de coeficiente de determinación significativos con las muestras de mortadela y cuando se procesaron todos los datos. Sin embargo, el coeficiente de determinación obtenido en este último caso fue muy bajo ( $R^2 = 0,50$ ) y sólo algunos parámetros del TPA tuvieron efecto significativo (valores  $t$  de Student significativos para adhesividad y dureza). Sin embargo, en el caso de las muestras de mortadelas el coeficiente de determinación fue de 0,86 ( $p < 0,0001$ ), con unos valores  $t$  de Student significativos en todos los parámetros de TPA. Este resultado cabe atribuirse a la elevada dispersión de valores que se ha obtenido para el grupo de galantinas y chópéd. Este parámetro deriva del área de la curva de deformación ante la aplicación de fuerzas de tracción, por lo que está condicionado por múltiples factores (longitud del comportamiento elástico y plástico, puntos de fluencia, etc.) que explicarían su elevada variabilidad, especialmente para los productos que contienen porciones o sólidos incluidos en la matriz proteica.

*En conjunto, el desarrollo de esta parte de la tesis doctoral permite ofrecer modelos de estimación de parámetros derivados de ensayos de tracción a partir de los resultados de un ensayo de TPA incrementando, de esta forma, la capacidad de información de este ensayo. En un trabajo futuro será necesario profundizar y mejorar el ajuste de estos modelos y proceder a su validación.*

#### V.4. ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO MECÁNICO DE TEJIDOS DE JAMÓN CURADO

En esta etapa de la tesis doctoral se analizó el comportamiento mecánico de distintos tejidos de jamón curado en un ensayo de tracción uniaxial destructivo (apartado IV. Resultados, Capítulo 1, artículo 1.4). En este estudio se consideraron dos músculos del interior del jamón (*biceps femoris* y *semitendinosus*) y otro expuesto al medio externo (*semimembranosus*), como se muestra en la Figura I.2.a. El análisis se completó con el estudio del tejido adiposo subcutáneo. De esta forma, se pretendía conocer el efecto de la dinámica de secado en distintos puntos del pernil, así como el de la penetración de la sal. El objetivo de estas experiencias fue avanzar en la predicción de la respuesta del producto loncheado cuando se solicita a fuerzas de tracción. Este análisis es complejo ya que la estructura muscular, característica de la carne, es anisotrópica y su comportamiento, ante la aplicación de determinadas fuerzas varía dependiendo de múltiples factores asociados a su estructura y procesado. En cualquier producto cárnico obtenido de la transformación de una parte anatómica (por ejemplo, lomo o jamón) se encuentran notables diferencias en el comportamiento reológico, no sólo al comparar piezas procedentes de distintos animales, sino incluso entre distintas porciones de una misma unidad. Estas diferencias se deben a la presencia de distintos tejidos (muscular, grasa y tejido conectivo), en diferentes proporciones y grado de superposición, además de las variaciones en la composición química. Todo ello condiciona las características físicas del producto y conduce a la existencia de una gran dispersión en la estimación de parámetros mecánicos (como la resistencia a la ruptura, límites elásticos, deformaciones elásticas, etc.). La complejidad anatómica de las piezas cárnicas contribuye a incrementar la dispersión de resultados. Otro factor adicional de variabilidad es el proceso que se aplique al alimento. El jamón curado es un producto en el que confluyen todos estos aspectos. Dada la dispersión de los valores que pueden obtenerse en cualquier ensayo mecánico aplicado a los productos cárnicos, no se consideró oportuno expresar, como es habitual, la resistencia a la ruptura obtenida en los ensayos de tracción como valor medio con una desviación estándar. Para ofrecer una mayor precisión de los resultados, se utilizó la función de distribución acumulada de Weibull (Dirikolu y col., 2002; Raischel y col., 2006) que permite determinar la probabilidad de que se produzca la ruptura del material ante la aplicación de una fuerza concreta. Este método se utiliza habitualmente en el estudio de la resistencia y

fatiga de materiales (Weibull, 1959; Borrero-López y col., 2009). Para el análisis de las curvas de esfuerzo-deformación derivadas de los ensayos de tracción se han utilizado como referencia experiencias realizadas en distintos tejidos y materiales, tales como el estudio en tejido conjuntivo realizado por Zeugolis y col. (2008), en paredes arteriales y piel por Silver (1987) y García Páez y col., (2003).

Estas experiencias se realizaron en jamón curado con Denominación de Origen Protegida (D.O.P.) Teruel (MAPA, 1993; Comisión Europea, 2006) con el fin de conseguir un muestreo lo más homogéneo posible al proceder de una producción estandarizada. Este tipo de jamón se elabora a partir de cerdos que se sacrifican con una edad comprendida entre 8 y 9 meses y un peso vivo entre 110 y 130 kg. Los perniles (de aproximadamente 11 kg y una grasa de cobertura de unos 4-5 cm) se curan en la región de Teruel (a 800 m sobre el nivel del mar) siguiendo normas estrictas de fabricación. En el estudio se han utilizado los tejidos de 30 jamones comerciales, todos ellos con 12 meses de curación.

En general, los parámetros físico-químicos estimados (pH,  $a_w$ , contenido en extracto seco, grasa y sal) estuvieron en el intervalo de valores que han sido referenciados para el jamón D.O.P. Teruel (Arnau y col., 1995; Fernández y col., 2007; Santos y col., 2008). El músculo con mayor porcentaje de extracto seco fue el *semimembranosus*, mientras que el *biceps femoris* presentó el mayor contenido en sales, coincidiendo con las indicaciones realizadas por diversos autores en este producto (Gou y col., 2004; Arnau y col., 1995; Fantazzini y col., 2009).

De acuerdo a lo anteriormente indicado, y como cabía esperar, la resistencia a la ruptura de los distintos tejidos estudiados presentó una considerable dispersión. En general, el músculo que presentó los valores más elevados fue el *semimembranosus*, mientras que el *semitendinosus* fue el menos resistente. El *biceps femoris* presentó valores intermedios, similares a los encontrados en distintos estudios (Hoz y col., 2008). Como era de esperar, la comparación de este parámetro con los valores detectados en los embutidos fermentados y productos cárnicos cocidos permitió apreciar la mayor resistencia, a las fuerzas de tracción de los tejidos de jamón curado, incluido el tejido adiposo subcutáneo. Las diferencias apreciadas responderían, lógicamente, al efecto de la disgregación de la estructura de la carne en los productos cárnicos frente al comportamiento del tejido muscular integro, en el jamón curado, y del tejido conjuntivo en el caso de la grasa subcutánea. No obstante, el músculo

*semitendinosus* presentó una resistencia a la ruptura muy similar ( $p > 0.05$ ) a la de los embutidos fermentados madurados, como fuet y mini-fuet. Este hecho posiblemente se deba a la mayor cantidad de grasa intramuscular que presenta este músculo. En jamones curados, se ha descrito una relación inversa entre el contenido en grasa y la dureza (Ruiz-Carrascal y col., 2000).

La grasa subcutánea está compuesta por adipocitos separados por una red de tejido conectivo, formado predominantemente por fibras de colágeno y pequeñas cantidades de fibras elásticas y reticulares (Sumena y col., 2010). La elevada resistencia detectada en este tejido (similar a la del músculo *semimembranosus*) cabe atribuirse al grado de desarrollo de las fibras de colágeno en el mismo, asociado al peso y edad de los animales de los que procedía el producto. Como se ha indicado, conforme aumenta la edad de sacrificio del animal, la red de tejido conectivo se hace más densa y el colágeno se vuelve más insoluble (Gerrard y Grant, 2003; Fang y col., 1999), aumentando así la resistencia de las estructuras.

En el análisis de los valores de la resistencia a la ruptura se obtuvieron, para todos los tejidos, elevados coeficientes de correlación ( $R^2$  entre 0,92 y 0,98) para la regresión lineal de Weibull, lo que indicó que los valores experimentales de este parámetro se podían describir razonablemente por la ecuación de distribución de Weibull (Weibull, 1959; Davies, 1973; Lawn, 1993; Wachtman, 1996; Dirikolu y col. 2002; Borrero-López y col., 2009). Las curvas obtenidas por la función de Weibull permitieron modelar la probabilidad de ruptura, a temperatura ambiente (22 °C), de los tejidos estudiados para distintas cargas. Para explicar la aportación que supone este estudio cabe indicar que a la hora de comparar cualquier parámetro reológico, en este caso la resistencia a la ruptura, si se utiliza una estadística descriptiva simple (medias y desviaciones estándar) se podría decir, por ejemplo para el músculo *semimembranosus*, decir que su resistencia a la ruptura es de  $23,3 \pm 5,9 \text{ N cm}^{-2}$ , y sólo difiere significativamente ( $p < 0,05$ ) del valor hallado en el músculo *semitendinosus* ( $10,7 \pm 2,3 \text{ N cm}^{-2}$ ). La obtención del intervalo de confianza al 95 % permitiría saber, además, que el valor mínimo de resistencia es de  $11 \text{ N cm}^{-2}$  y el máximo de  $22 \text{ N cm}^{-2}$ . Sin embargo, si en este contexto se aplica la distribución de Weibull, se podría conocer el porcentaje de muestras que rompen con cada nivel de carga aplicada. Por ejemplo, el 99 % de las muestras de *semimembranosus* romperían al someterse a  $51 \text{ N cm}^{-2}$  y permanecerían libres de ruptura con la aplicación de una carga inferior o igual a  $8 \text{ N cm}^{-2}$ . Al menos el 63 % de las muestras de este músculo rompería al recibir cargas de  $26 \text{ N cm}^{-2}$ . De acuerdo con

este estudio, el *biceps femoris* rompería al someterse a  $48 \text{ N cm}^{-2}$  con una certeza del 99 % y la aplicación de  $23 \text{ N cm}^{-2}$  supondría la ruptura del músculo *semitendinosus*, mientras que apenas el 50 % de las muestras de *semimembranosus* o de tejido graso subcutáneo lo harían. Sería necesario aplicar cargas inferiores a  $4 \text{ N cm}^{-2}$  para tener la certeza (al 99 %) de integridad de todos los tejidos estudiados.

El módulo de Weibull ( $m$ ) da una idea de la homogeneidad de los valores del parámetro estudiado, de forma que cuanto mayor es  $m$ , mas homogéneos son los datos experimentalmente obtenidos (Zhao, 2008). Teniendo en cuenta este módulo, pudo establecerse que *semitendinosus* fue el músculo que tuvo una resistencia a la fractura más uniforme al someterse a fuerzas de tracción mientras que la respuesta de *biceps femoris* fue la más heterogénea. El esfuerzo característico ( $\sigma_\theta$ ) permite comparar la distribución de valores, siendo la resistencia más elevada a mayor  $\sigma_\theta$  ( $p < 0,05$ ). De acuerdo con este valor, los músculos estudiados podrían ordenarse de menor a mayor resistencia a la ruptura de la siguiente forma: *semitendinosus* < *biceps femoris* < *semimembranosus*. La respuesta del tejido subcutáneo fue similar a la del músculo *semimembranosus* en cuanto a resistencia a la ruptura y dispersión de datos en las estimaciones experimentales.

A pesar de la dispersión de los valores de la resistencia a la ruptura en los distintos tejidos, las curvas de esfuerzo-deformación obtenidas en los ensayos de tracción destructivos presentaron formas características para cada tipo de tejido. Estas curvas reflejan cómo las tensiones internas producidas por la aplicación de las fuerzas de tracción aplicadas son absorbidas por cada material y cómo es su repuesta de deformación.

En el músculo *semimembranosus* las curvas se diferenciaron de las obtenidas con otros músculos por presentar una región elástica con mayor pendiente (mayores esfuerzos y menores deformaciones) y una larga región plástica. Este músculo, antes de romperse, presentó un punto de fluencia relacionado con una leve reducción de su sección transversal. El *biceps femoris* presentó una primera etapa en la que se producen mínimas deformaciones con bajos esfuerzos debido, probablemente, al alineamiento de las fibras musculares y del tejido conjuntivo que las rodea, para pasar, seguidamente, a un período elástico con baja pendiente (pequeños esfuerzos y mayores deformaciones). En este músculo, la región plástica fue corta y con varios puntos de fluencia asociados a reducciones de la sección transversal, que llevarían finalmente a la ruptura. El músculo



*semitendinosus* fue el que menos resistencia ofreció a la deformación, presentando curvas con bajas pendientes y una región plástica muy corta. Se entiende que este músculo rompería por la progresiva separación del entramado de tejido conjuntivo que rodea a las fibras musculares y la consiguiente disgregación de los haces de fibras musculares. La ruptura estaría facilitada por el mayor grado de infiltración grasa que caracteriza este músculo (Kim y col., 2008). El tejido adiposo subcutáneo presentó un período elástico con elevada pendiente y una región plástica corta, que condujo a la ruptura sin que presentase puntos de fluencia. Este comportamiento se ha asociado con la progresiva elongación y rotura de la red de fibras de tejido conjuntivo en la que se localizan los adipocitos.

Los perfiles de las curvas de esfuerzo-deformación de los tejidos estudiados se ajustaron a formas descritas por diversos autores, teniendo en cuenta las pendientes y características de la región elástica. Entre las formas definidas se encuentran las denominadas “J” y “S”; la primera se ha descrito en múltiples tejidos y biomateriales (Zeugolis y col., 2008, Wang y col., 1991; Atkins y Mai, 1985; Silver, 1987; Chen Guo y Mi, 1994; Veronda y Westman, 1970; Christensen y col., 2003), mientras que la segunda se ha observado en tejidos deshidratados (Zeugolis y col., 2008). En la primera se englobaría el comportamiento de los músculos *biceps femoris* y *semitendinosus*, mientras que en la forma “S” podrían encuadrarse las respuestas del músculo *semimembranosus* y del tejido adiposo subcutáneo.

En conjunto, las curvas de esfuerzo-deformación indicaron que *biceps femoris* y *semitendinosus* fueron más elásticos que *semimembranosus*, ya que los primeros se deformaron más (en este caso, se elongaron más) con menores cargas. El músculo *semimembranosus* fue más resistente a la deformación. Este músculo, junto con el tejido subcutáneo, presentó los límites elásticos más elevados.

En el músculo *semimembranosus*, y en relación con los otros dos músculos estudiados, el contenido de grasa intramuscular es menor (Candek-Potokar y col., 2002; Maddock y col., 2002) así como de colágeno y el sarcómero es de mayor longitud (Wheeler y col., 2000). Estas características estructurales explicarían el mayor requerimiento energético de este músculo para deformarse y romperse. Por otra parte, la extensión de las regiones elástica y plástica se ha relacionado con procesos de deshidratación y depósito de sales en tejido conjuntivo. Zeugolis y col. (2008), en fibras de colágeno extrusionadas, observaron un incremento del límite elástico con la



deshidratación de las mismas y obtuvieron curvas con formas similares a las mostradas por el músculo *semimembranosus*. Cambios similares se han descrito con el incremento del depósito de minerales en tejidos fibrosos (Jäger y Fratzl, 2000; Landis y col. 1995).

Los resultados obtenidos sugieren que la deshidratación tiene un marcado efecto en las propiedades mecánicas de los músculos que constituyen un jamón curado. El *semimembranosus* es indudablemente el músculo más expuesto a la deshidratación, favorecida tanto por su posición externa como por su menor contenido graso (Candek-Potokar y col., 2002; Maddock y col., 2002). Sin embargo, el *semitendinosus* es el que ocupa una posición más profunda en el jamón y, aunque el *biceps femoris* es más externo, está rodeado por una capa gruesa de grasa (Figura I.2.a), por lo que la pérdida de agua está condicionada. En relación con este hecho, ambos músculos presentaron menor contenido de extracto seco ( $p < 0,05$ ) que el *semimembranosus*. Por otra parte, el comportamiento mecánico del *biceps femoris* se ha relacionado con su elevada actividad proteolítica durante el proceso de maduración del jamón curado (Virgili y col., 1995; Parolari y col., 1994; García-Garrido y col., 2000; Rico y col., 1991; Toldrá y col., 1992), que explicaría su menor resistencia a la tracción frente a la mostrada por el *semimembranosus*.

*Se entiende que el trabajo realizado en esta etapa de la tesis doctoral constituye un estudio preliminar para entender el comportamiento mecánico del jamón curado y que es necesario seguir investigando en esta línea. En un trabajo futuro, cabría analizar la resistencia de las fases y estructuras (grasa, tejido conjuntivo) existentes entre los distintos tipos de músculo, y paquetes musculares, para un mayor acercamiento a la respuesta de este producto cárnico, por ejemplo cuando se corta o lonchea. Se considera que las experiencias realizadas pueden aportar un enfoque distinto acerca del estudio de productos cárnicos. Por una parte, se ha comprobado que el modelo de distribución acumulada de Weibull permite estimar la probabilidad de ruptura de ciertos tejidos. Un procedimiento similar podría utilizarse en otros productos cárnicos y para otras características en las que cabe esperar una elevada variabilidad. Por otra parte, se ha observado que las curvas de esfuerzo-deformación derivadas de ensayos de tracción, constituyen una herramienta útil para analizar el comportamiento mecánico de productos cárnicos y podrían utilizarse para analizar el efecto de distintos procesos. En esta línea, los resultados obtenidos y las condiciones de ensayo se utilizaron para valorar la aplicación de agentes de ligazón en frío para la reestructuración de pernils*

*susceptibles de someterse a un proceso de salado y maduración para obtener jamón curado que, a fin de cuentas, es el objetivo principal de esta tesis doctoral.*

#### **V.5. VIABILIDAD DE LOS AGENTES DE LIGAZÓN EN FRÍO DE ORIGEN ANIMAL Y DE LA TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA (MTGasa) PARA LA REESTRUCTURACIÓN DE PERNILES DESHUESADOS. POTENCIAL PARA LA FABRICACIÓN DE JAMÓN CURADO**

Los primeros pasos dados en esta etapa de la tesis estuvieron orientados a incrementar el conocimiento existente sobre el empleo de agentes de ligazón en frío de origen animal y resolver algunos aspectos requeridos para afrontar su objetivo final: elaborar jamón curado a partir de pernils reestructurados en fresco. Era sabido que la enzima transglutaminasa (MTGasa) establecía uniones o interacciones estables entre superficies cárnicas e incluso se conocía su mecanismo de acción (Motoki y Seguro, 1998; Yokoyama y col., 2004; Zhu y Tramper, 2008). En este campo existían diversas y notables aportaciones, era muy probablemente el agente de gelificación y ligazón en frío más utilizado en la industria cárnica para la elaboración de productos reestructurados (Dimitrakopoulou y col., 2005), así como para mejorar y modificar la textura y las características sensoriales y mecánicas de salchichas y otros geles cárnicos (Carballo y col., 2006; Dondero y col., 2006). También era conocida la aparición en el mercado de preparados con capacidad de ligazón en frío elaborados a partir de plasma sanguíneo de distinto origen (bovino y porcino). En concreto, se trataba de la comercialización del sistema binario fibrinógeno-trombina (FT) (Fibrimex®, Sonac B.V., Loenen, Holanda) y con posterioridad de un concentrado de proteínas de plasma sanguíneo enriquecido en fibrinógeno (PP) (Plasma Powder FG Porcine, Sonac B.V., Loenen, Holanda). El primero de ellos se introdujo pronto en aplicaciones industriales y se había estudiado su aplicación en productos de carne y pescado (Beltrán-Lugo y col., 2005; Tsai y col., 2006; Flores y col., 2007; Fort y col., 2007; Moreno y col., 2008; Lennon y col., 2010; Cofrades y col., 2011). El segundo, más novedoso, era todavía bastante desconocido y su aplicación era muy reducida. En ambos casos no había o eran muy pocas las referencias bibliográficas existentes en las que se trataran en profundidad los mecanismos de acción y el tipo de interacción establecidas con los componentes de miosistemas. No obstante, estos agentes de ligazón en frío abrían la posibilidad de elaborar productos cárnicos reestructurados sin adición de

componentes ajenos a su composición. Esta fue la causa por la que se optó por emplear, los de origen porcino, para la reestructuración de pernils en fresco, junto con MTGasa, un agente de ligazón hasta entonces más estudiado y contrastado.

En los tres agentes de ligazón era conocida la capacidad de establecer interacciones termo-estables con superficies cárnicas y que los productos reestructurados obtenidos podían someterse a tratamiento térmico y congelación sin que se afectara su estabilidad (Min y Green, 2008; Opoku y col., 2005; Tseng y col., 2006). Sin embargo, no existían referencias bibliográficas de la estabilidad de las uniones en procesos de salado y secado que confluyen en la elaboración de jamón curado. Que la autora sepa, no existen referencias bibliográficas de aplicación de los mencionados agentes de ligazón para la elaboración de jamón curado desde pernils reestructurados; únicamente cabría mencionar el empleo de MTGasa en carne salada para elaborar un producto reestructurado (Costa y col., 2008; Costa-Corredor y col., 2009). No obstante el objetivo y forma de proceder difieren del trabajo de esta tesis.

En este contexto, se llevaron a cabo experiencias orientadas a conocer los mecanismos de acción de los agentes de ligazón derivados del plasma sanguíneo en sistemas cárnicos y determinar cómo serían afectados o modificados por las condiciones del proceso de elaboración de jamón curado. Para ello se eligió inicialmente un modelo sencillo: una emulsión cárnica a la que se adicionaron los agentes de ligazón en frío en presencia y ausencia de sal (apartado IV. Resultados, Capítulo 2, artículos 2.1 y 2.2). Se consideró que este modelo sería una buena representación de lo que sucedería entre dos superficies cárnicas unidas por los agentes de ligazón. Los cambios estructurales se analizaron a través de los parámetros obtenidos en la imagen de resonancia magnética nuclear (IRM) y de los derivados del análisis del comportamiento reológico. El sistema PP, al igual que la MTGasa, al comercializarse en forma de polvo, se utilizó deshidratado o en solución (en agua o en soluciones salinas). En el caso del sistema binario FT, las soluciones de trombina y fibrinógeno se mezclaron para obtener geles de fibrina, que fueron también estudiados, o se mezclaron con miosistemas (apartado IV. Resultados, Capítulo 2, artículo 2.1 y Capítulo 3, artículo 3.3). De esta forma, se quisieron simular las distintas condiciones en las que el sistema de ligazón y las superficies cárnicas podrían entrar en contacto.

Estos primeros estudios realizados con los agentes ligazón en frío derivados del plasma sanguíneo presentaron además la novedad de utilizar una técnica no invasiva

como la IRM, donde existían escasos antecedentes de uso en matrices alimentarias. En estos análisis se obtuvieron los dos tiempos de relajación, longitudinal ( $T_1$ ) y transversal ( $T_2$ ), y el coeficiente de difusión aparente (ADC, del inglés *apparent diffusion coefficient*), en contraste con la mayoría de los estudios realizados hasta este momento. En el campo alimentario sólo se utiliza uno de estos parámetros, o como mucho dos. Esta técnica aporta importante información estructural en el análisis de tejidos y otros biomateriales y con este fin se ha utilizado en múltiples trabajos (Boulby y Rugg-Gunn, 2003; Gowland y Stevenson, 2003; Wheeler-Kingshott y col., 2003). En el campo de la ciencia y tecnología de la carne se ha empleado fundamentalmente para estudiar estructuras (Bertram y Andersen, 2004), determinar la distribución del tejido adiposo, conectivo y el tipo de fibra muscular (Bonny y col., 2000; Laurent y col., 2000; Mitchell y col., 2001), evaluar el procesado y almacenamiento de la carne (Bertram y col., 2004; Renouy col., 2003) y para correlacionar factores como contenido acuoso, atributos sensoriales y difusión de la sal (Cernadas y col., 2005; Ruiz-Cabrera y col., 2004; Shaarani y col., 2006). Las experiencias realizadas durante el desarrollo de esta tesis, suponen una nueva aplicación de esta técnica, al utilizarse para el análisis de geles cárnicos y establecer relaciones entre parámetros de IRM y de textura.

La incorporación de los sistemas de ligazón en frío de plasma sanguíneo (FT y PP) a emulsiones cárnicas (apartado IV. Resultados, Capítulo 2, artículos 2.1 y 2.2) modificó sus propiedades reológicas, aportándoles mayor consistencia. Sin embargo, este efecto, en ambos sistemas, fue modificado por la presencia de NaCl. En ausencia de sal, FT y PP confirieron a las emulsiones cárnicas una elevada estabilidad mecánica incrementándose los parámetros del TPA, dureza, cohesividad y elasticidad, y la fuerza de rotura, mientras que se redujo la adhesividad. Estas modificaciones del comportamiento reológico de las emulsiones cárnicas indicarían cambios estructurales asociados al proceso de gelificación. Una matriz emulsionada (como es la cárnica) presenta escasa resistencia a la compresión y elevada adhesividad, como corresponde a un fluido pseudoplástico. Sin embargo, la organización de su estructura con el establecimiento de interacciones intermoleculares, característica de una matriz gelificada, reduce la adhesividad e incrementa su dureza y resistencia a la ruptura. Los cambios reológicos producidos en las emulsiones cárnicas adicionadas con FT o con PP evidenciaron la capacidad de ambos preparados para producir la gelificación en frío de estos miosistemas. Estas emulsiones cárnicas presentaron una dureza (algo mayor en el caso de PP) y, en conjunto, características reológicas muy próximas. Varios autores

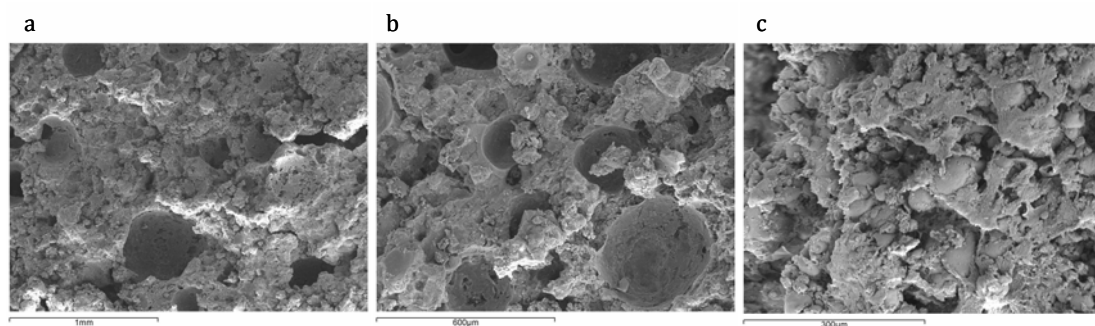
han encontrado también valores similares (Boles y Shand, 1998; Pietrasik y col., 2007) en productos reestructurados con diversos agentes de ligazón en frío (como MTGasa). La dureza presentada por las emulsiones cárnicas adicionadas con PP (6 %) estuvo en el intervalo de valores mostrado por algunos productos cocidos, como por ejemplo por ciertas galantinas (en torno a 20 N). En las experiencias realizadas con emulsiones cárnicas adicionadas con distintas cantidades de FT se obtuvo un incremento lineal de la dureza y de la resistencia a la ruptura al aumentar la presencia de FT. Para obtener características reológicas similares a las mostradas por los productos cocidos elaborados a partir de emulsiones cárnicas se requirió adicionar este sistema en cantidades próximas al 20%.

Basándonos en las experiencias realizadas en IRM por diversos autores (Simpson y col., 2003), es posible analizar la estructura de una matriz a partir de parámetros de IRM. El tiempo de relajación transversal o  $T_2$  es especialmente sensible a la porosidad de las muestras y valores altos se asocian a la presencia de grandes poros o espacios en una matriz organizada (Simpson y col., 2003; As y Lens, 2001). El tiempo de relajación longitudinal o  $T_1$  es una medida de la movilidad de las moléculas (en particular las del agua). Sin embargo, este tiempo de relajación longitudinal depende de su entorno; cuando el agua está cerca de macromoléculas, tales como proteínas, el valor del tiempo de relajación longitudinal disminuye (Gowland y Stevenson, 2003). El ADC se considera una medida del movimiento de traslación del agua. En las estructuras compartimentadas, el ADC se incrementa con el aumento de los volúmenes de los espacios (Wheeler-Kingshott y col., 2003).

Los parámetros de IRM ( $T_1$ ,  $T_2$  y ADC) de las emulsiones cárnicas adicionadas con FT y PP mostraron valores muy similares. Sin embargo, los geles de fibrina (FT) y el sistema PP rehidratado presentaron parámetros muy distintos. El sistema FT, sin adición de sal, presentó valores de  $T_2$  más bajos, indicando una estructura con espacios menores, y un  $T_1$  más elevado, que se relaciona con menor interacción con macromoléculas, aspecto confirmado por su mayor ADC. En el caso del sistema PP, el menor valor de  $T_1$  se considera consecuencia de su estructura en polvo, lo que haría que partículas del mismo quedaran (interaccionando con el agua) en los espacios surgidos en la organización de su matriz proteica. De acuerdo con el valor  $T_2$ , el sistema PP presentaría una estructura más porosa que los geles de FT. Esta presencia de finas partículas interaccionando con el agua estaría refrendada por el bajo valor de ADC de estos sistemas. El análisis comparativo de las imágenes de IRM y de los parámetros  $T_1$ ,

$T_2$  y ADC de las emulsiones cárnicas, sin y con adición de los sistemas de ligazón en frío, permitió deducir que el empleo de FT y PP da lugar a la formación de geles constituidos por el entrecruzamiento de componentes proteicos que originan una red tridimensional de elevada porosidad (altos  $T_2$ ) y contenido de agua ligada (altos  $T_1$  y ADC). Los resultados de IRM se refrendaron al establecerse una correlación positiva entre el parámetro  $T_1$  y la estabilidad mecánica (dureza, elasticidad, cohesividad, resistencia a la ruptura) de las emulsiones cárnicas adicionadas con PP y FT.

Para una mejor apreciación de estas estructuras, en la Figura 2 (apartado IV. Resultados, Capítulo 3, artículo 3.3) se encuentra la imagen de MEB de un gel de FT y en la Figura V.1 se muestran las correspondientes a un sistema PP rehidratado.



**Figura V.1.** Microscopía electrónica de barrido (MEB) usando imágenes de electrones secundarios del sistema de ligazón de proteínas de plasma sanguíneo (PP) rehidratado con agua mostradas a 50 (a), 100 (b) y 200 (c) aumentos.

Las modificaciones del comportamiento reológico de las emulsiones cárnicas tratadas con FT se han relacionado con la formación de una red tridimensional asociada al proceso de polimerización de la fibrina y la consiguiente formación de geles, en un mecanismo similar al acontecido en la generación de coágulos sanguíneos (Weisel, 2004; Weisel, 2005; Standeven y col., 2005). En los ensayos realizados con geles de FT, se observó su elevada dureza y cohesividad (alcanzando valores de dureza de hasta 70 N). Estos resultados se relacionan con los hallazgos referidos por otros autores (Ryan y col., 1999; Weisel, 2004) que describen la elevada rigidez y resistencia de los coágulos de fibrina. La similitud de los geles obtenidos en esta tesis doctoral con los de fibrina formados en procesos fisiológicos pudo apreciarse en el análisis de las

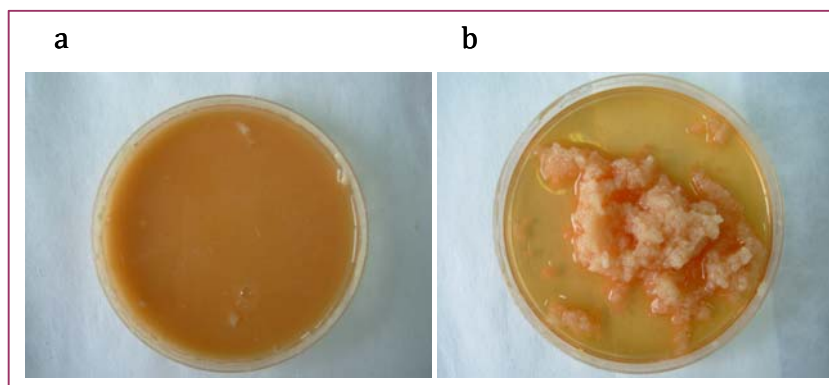
fotografías de microscopía electrónica de barrido (apartado IV. Resultados, Capítulo 3, artículo 3.3).

En el caso del uso de sistemas PP, se considera que, además de la formación de redes de fibrina (derivadas del fibrinógeno y del contenido de trombina que presenta el plasma), estarían implicados otros mecanismos de interacción proteína-proteína y proteína-agua. El estudio por espectroscopía de Raman de emulsiones cárnicas adicionadas con este agente de ligazón en frío (Herrero y col., 2009), evidenció un incremento de las interacciones hidrofóbicas que podría estar relacionado con la gelificación o estructuración de estas matrices cárnicas. En estas interacciones estarían implicados grupos alifáticos de las proteínas del plasma sanguíneo (Herrero y col., 2008; Li-Chan, 1996). Se observó, además, que la adición de PP producía modificaciones en la matriz proteica relacionadas con un incremento de acodamientos y de estructura desordenada (Herrero y col., 2009). De acuerdo con estos hallazgos, en la ligazón en frío promovida por el sistema PP jugaría un importante papel el establecimiento de interacciones hidrofóbicas entre las proteínas miofibrilares y las del plasma.

La presencia de sal atenuó, o prácticamente anuló, el efecto de la adición de FT en las propiedades reológicas de las emulsiones cárnicas, reduciéndose notablemente su dureza (de 14 N en ausencia de sal a 5,3 N en presencia de un 2 %). El mismo efecto se produjo en la resistencia mecánica de los geles de FT. Todo parece indicar que este hecho se debe al papel del ión cloro en la formación de los geles de fibrina, según se deduce de estudios fisiológicos de la coagulación sanguínea. Este ión actúa como un modulador fisiológico de la polimerización de la fibrina, condicionando la formación de geles a partir de fibrinógeno (Standeven y col., 2005; Di Stasio y col., 1998; Papi y col., 2005). De Spirito y col. (2003) observaron que, cuando se incrementaba la concentración de sal, la fibrina presentaba fibras más ramificadas y más finas. Este hecho se debe a que el  $\text{Cl}^-$  se une a la fibra de fibrina, oponiéndose a la agregación lateral de protofibrillas. De esta forma, se producen fibras más delgadas y se impide su polimerización y, consecuentemente, la formación del gel o la organización de una red tridimensional estable y consistente (Standeven y col., 2005; Vindigni y col., 1996). En esta línea, en las experiencias realizadas con FT adicionando distintos porcentajes de NaCl (apartado IV. Resultados, Capítulo 3, artículo 3.3) se observó que con la adición de un 20 % de sal no se producía la gelificación de las mezclas de fibrinógeno trombina, mientras que con un 10 % de sal se obtenían geles muy poco consistentes (Figura V.2).



Sólo cuando la incorporación de sal fue igual o inferior al 1 %, se consiguieron geles con características reológicas similares a los obtenidos en ausencia de sal. De todo ello se dedujo que no era conveniente superar el 2 % de sal cuando se adiciona FT para obtener geles de fibrina como elemento de cohesión entre superficies cárnicas.



**Figura V.2.** Mezclas de fibrinógeno y trombina adicionados con 1 % NaCl (a) y con 20 % de NaCl (b).

La adición de sal también redujo la estabilidad mecánica de las emulsiones cárnicas adicionadas con PP, de forma que la fuerza de ruptura se redujo a la mitad y la dureza lo hizo al 60 % (de 20 N a 12,5 N en ausencia y en presencia de un 2% de NaCl, respectivamente) mientras que se incrementó la adhesividad. Sin embargo, el plasma rehidratado presentó características reológicas muy similares con o sin presencia de sal. Por lo que cabe deducir que el efecto de la sal se debe, en este caso, a su papel en el establecimiento de interacciones entre el agente de ligazón y las proteínas de la carne. En el mencionado estudio de los sistemas cárnicos por espectroscopía de Raman (Herrero y col., 2009) se encontró que, en presencia de sal, se incrementaban las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas de las proteínas miofibrilares. Si, como anteriormente se ha indicado, el efecto de ligazón de PP se debe, al menos en parte, al establecimiento de interacciones de esa naturaleza con las proteínas de la carne, las modificaciones producidas por la adición de sal conllevarían a una menor disposición de grupos para su interacción con las proteínas del plasma y, en consecuencia, la ligazón sería menor (tanto más cuanto mayor sea la adición de sal).

Siguiendo el plan de trabajo diseñado para el desarrollo de esta tesis doctoral, el estudio se continuó con modelos elaborados con piezas cárnicas, en los que se analizó el efecto de diversas variables: tratamiento de las superficies cárnicas, preparación de



los sistemas cárnicos, temperatura y tiempo de ligazón y envasado. Siguiendo un diseño experimental multifactorial, los distintos niveles incluidos en cada variable, y la repetición de cada condición de procesado (al menos por triplicado) en las experiencias realizadas con cada sistema de ligazón en frío se elaboraron más de 300 modelos. La viabilidad de las condiciones de procesado ensayadas se valoró teniendo en cuenta, tanto la intensidad de la fuerza de ligazón alcanzada, como la velocidad a la que se desarrollaron las uniones. Los resultados obtenidos permitieron afrontar, finalmente, la investigación en pernils deshuesados.

En la Tabla V.2 se resumen las condiciones más adecuadas para la reestructuración de pernils deshuesados en fresco derivadas de los resultados obtenidos en las distintas experiencias realizadas en esta tesis doctoral. Las condiciones seleccionadas fueron las que aportaron la mayor fuerza de ligazón después de que las piezas fueron saladas y secadas (durante 10-15 semanas). En esta tabla también se analizan la estabilidad de los productos en relación con derivados cárnicos comerciales.

Sistemas de ligazón en frío		Condiciones de procesado			Parámetros de ligazón			Resistencia mecánica equivalente		
Agente de ligazón	Denominación del producto	Tratamiento de la superficie de la cárnica	Preparación del agente de ligazón	Salazonado	Velocidad pre-salado*	Fuerza máxima pre-salado	Fuerza máxima en producto final**	Relación con perfiles de textura <sup>a</sup>	Probabilidad de ruptura (%) (distribución de Weibull)	
					N cm <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup>	N cm <sup>-2</sup>			ST	BF
MTGasa	ACTIVA® EB	S	P	VS	0,20 ± 0,01	1,17 ± 0,32	6,73 ± 0,37	perfil A y B	17,3	18,1
		S	R3	VS	0,17 ± 0,02	1,94 ± 0,26	6,21 ± 0,41	perfil A y B	18,9	19,4
FT	Fibrimex®	I	FT-0,25	VS	0,33 ± 0,04	2,55 ± 0,25	5,98 ± 0,51	perfil A y B	18,5	21,3
		I	FT	VS	0,45 ± 0,04	2,47 ± 0,29	5,4 ± 0,73	perfil A y D	15	19
		I	FT	A	0,45 ± 0,04	2,47 ± 0,29	5,01 ± 0,69	perfil A y D	12,9	17,5
PP	Plasma Powder FG Porcine	U	P	A	0,28 ± 0,06	1,51 ± 0,31	10,63 ± 1,57	perfil A y B	52,1	38,8
		U	R0	A	0,25 ± 0,05	1,29 ± 0,43	10,22 ± 1,75	perfil A y B	49,1	37,4
		U	R0,5	A	0,11 ± 0,02	0,86 ± 0,36	12,73 ± 1,19	perfil A y B	66,7	46
		U	R1,5	A	0,09 ± 0,03	0,86 ± 0,31	11,87 ± 1,97	perfil A y B	61	43,1
		I	R3	A	0,08 ± 0,02	1,57 ± 0,44	10,04 ± 1,67	perfil A y B	47,7	36,7

**Tabla V.2.** Condiciones más adecuadas para la reestructuración de pernils deshuesados en fresco sometidos a salado y secado.

\* Calculado en modelos cárnicos.

\*\* Fuerza máxima al final de la experiencia.

<sup>a</sup> Fuerza máxima en el pre-salado de los pernils.

S: superficie cárnica tratada con una mezcla de sales (NaCl, 200 ppm de KNO<sub>3</sub> y 100 ppm de NaNO<sub>2</sub>) y retirada con una salmuera al 3 % de dichas sales. I: superficie cárnica sumergida en una salmuera al 3 % de una mezcla de sales (NaCl, 200 ppm de KNO<sub>3</sub> y 100 ppm de NaNO<sub>2</sub>). U: superficie cárnica sin tratar.

P: sistema de ligazón en polvo. R3: sistema de ligazón rehidratado en solución salina al 3 % de NaCl. FT-0,25: 100 mL de fibrinógeno se mezclan con la correspondiente cantidad de NaCl para obtener una concentración final en la mezcla FT de 0,25 % de NaCl. FT: mezcla de fibrinógeno y trombina (F/T 10/1, v,v). R0: sistema de ligazón rehidratado en agua destilada. R0,5: sistema de ligazón rehidratado en solución salina

al 0,5 % de NaCl. R1,5: sistema de ligazón rehidratado en solución salina al 1,5 % de NaCl.

VS: tiempo de ligazón simultáneo al proceso de salado. A: salado después del tiempo de ligazón.

La resistencia equivalente indica el perfil de textura (Capítulo 1 de Resultados) de los productos comerciales analizados que presenta una resistencia a la ruptura similar a la fuerza de ligazón del producto final.

Weibull: probabilidad de ruptura de distintos tejidos de jamón curado con una fuerza equivalente a la fuerza de ligazón.

En algunos ensayos realizados, durante el secado de los perniles reestructurados, se produjo proliferación de microorganismos en las zonas de unión con la consiguiente formación de gas y ruptura de las interacciones. Para controlar estas incidencias, se incorporaron sales nitrificantes (200 ppm de  $\text{KNO}_3$  y 100 ppm de  $\text{NaNO}_2$ ) al NaCl o a las soluciones salinas con las que se trataron las superficies cárnicas o se rehidrataron los sistemas MTGasa y PP.

Cabe destacar que, en todos los casos, las fuerzas de ligazón se incrementaron durante el tiempo de secado, como puede apreciarse en la Tabla V.2 (fuerza máxima en pre-salado vs fuerza de ligazón en perniles reestructurados curados). Se alcanzaron valores de fuerza de ligazón estables a partir de las 7-8 semanas de esta etapa, cuando se empleó MTGasa, y a las 3-4 semanas, cuando los sistemas de ligazón fueron FT o PP. Estos valores normalmente coincidieron con una  $a_w$  en torno a 0,87 y un contenido de sal de alrededor del 14 % (g NaCl/g materia seca desengrasada). En general, se ha detectado una correlación positiva entre la  $a_w$  y la CRA con el incremento de la fuerza de ligazón de las piezas durante el secado. El incremento de la fuerza de ligazón durante el secado demuestra la estabilidad de las uniones originadas por los sistemas de ligazón estudiados. Este aumento podría estar relacionado con el incremento de la resistencia de estructuras fibrosas con el secado y el depósito de sales (Zeugolis y col., 2008; Jäger y Fratzl, 2000; Landis y col., 1995).

Las fuerzas de ligazón (Tabla V.2) más elevadas se presentaron en los perniles reestructurados con el sistema PP tras su salado y secado, donde se alcanzaron valores entre 10 – 13 N cm<sup>-2</sup>, similares a la resistencia a la ruptura mostrada por el músculo *semitendinosus* de jamón de D.O.P Teruel. Con la MTGasa se alcanzaron fuerzas de ligazón entre 6 y 7 N cm<sup>-2</sup>, equivalentes a la resistencia a la ruptura presentadas por un embutido fermentado del perfil de textura A o B (tipo fuet o mini-fuet). El sistema FT aportó a las piezas fuerzas de ligazón similares (en torno a 5 - 6 N cm<sup>-2</sup>). Para una mejor

equivalencia de estas fuerzas de ligazón, cabe indicar que con la fuerza requerida para separar las uniones de los productos ligados con el sistema PP se romperían aproximadamente el 55% de las muestra procedentes del músculo *semitendinosus* y el 45 - 50 % de las del músculo *biceps femoris* (Tabla V.2).

Los pernils reestructurados con MTGasa sólo fueron viables en los procesos de salado y secado, cuando se elaboraron a partir de piezas cuyas superficies cárnicas habían sido previamente tratadas con sal. Probablemente este medio favorece la liberación de exudados que facilitan la solubilización y difusión de la MTGasa. De esta forma, se potenciaría el establecimiento de enlaces covalentes (glutamina-lisina) catalizados por esta enzima (Yokoyama y col., 2004). Con el empleo de este sistema de ligazón, fue posible simultanear el proceso de ligazón y salado en el interior de envases cerrados al vacío, en los que las piezas estaban rodeadas de sal. Este proceder supuso mantener o incluso incrementar la fuerza de ligazón desarrollada. Este hecho se atribuye a la presión que ejercería la sal sobre las superficies cárnicas al encontrarse en el interior de los envases a vacío. Esto facilitaría el contacto entre las superficies cárnicas a unir y el establecimiento de interacciones.

Las múltiples experiencias realizadas con el sistema FT (apartado IV. Resultados, Capítulo 3, artículo 3.3) indicaron que las condiciones más adecuadas para la reestructuración de pernils eran aquellas en las que las superficies cárnicas fueron previamente tratadas por inmersión en solución salina, para posteriormente aplicar la mezcla FT (10/1, v/v) con o sin sal (0,25%) y un pH entre 8 - 8,4. Estos resultados coinciden con las afirmaciones de diversos autores (Álvares y col., 2009; Chen y Lin, 2002) sobre las condiciones más apropiadas para la funcionalidad del fibrinógeno y la trombina. Barrett y col. (2004) encontraron que esta última era más activa en presencia de bajas concentraciones de sal (en torno a 0,1 M de NaCl), manteniéndose a un pH 8, lo que serían condiciones similares a las que se utilizaron en el procesado de los pernils en este trabajo.

Aunque, como se ha mencionado anteriormente, la presencia de sal condiciona el proceso de formación de los geles de fibrina, los pernils reestructurados con el sistema FT pudieron envasarse rodeados de sal para simultanear, como en el caso de la MTGasa, el proceso de ligazón y de salado. Este hecho posiblemente se deba a la rapidez con la que se forman los geles de fibrina. Cuando los pernils se envasaron habría pasado el tiempo suficiente como para que los geles estuviesen preformados o al

menos iniciados los mecanismos de gelificación y se habría superado la etapa de formación de las fibras de fibrina que es donde actúa el  $\text{Cl}^-$  (De Spirito y col., 2003). Este binomio debe aplicarse antes de 15 minutos para que pueda extenderse y moldearse en el perímetro de las superficies cárnicas. Después de este tiempo, muestra claros signo de gelificación.

En los ensayos realizados con sistemas modelo ligados con PP, las fuerzas de ligazón fueron significativamente más bajas cuando las superficies cárnicas se trataron con sal directamente, contrariamente a lo que sucedió con el sistema MTGasa. Este último hecho estaría relacionado con la elevada cantidad de sal que, con este procedimiento, llega a la superficie cárnica. Teniendo en cuenta, el mencionado estudio de Herrero y col. (2009), las superficies cárnicas tendrían menos posibilidades de interaccionar con este agente de ligazón en estas circunstancias. Sin embargo, cuando las superficies cárnicas fueron tratadas por inmersión, la baja concentración de sal facilitaría la solubilización parcial de las proteínas miofibrilares, de acuerdo con las afirmaciones de Gordon y Barbut (1992) y favorecería el establecimiento de las interacciones con el agente de ligazón. Una situación similar se daría cuando los modelos cárnicos se reestructuraron sin tratamiento previo de las superficies con la aplicación del sistema PP rehidratado con soluciones salinas. En la reestructuración de perniles se obtuvieron resultados análogos a los mostrados por estos modelos cárnicos. Cabe indicar que los perniles reestructurados con este agente de ligazón no pudieron salarse hasta la finalización del proceso de ligazón (10 - 12 horas para asegurar el desarrollo de la máxima estabilidad). Cuando se sometieron de forma simultánea a ligazón y salado en el interior de envases, las uniones fueron muy inestables. Este comportamiento se ha atribuido a la penetración de sal en las interfases de la estructura superficie cárnica-sistema de ligazón-superficie cárnica que impediría, en los primeros estadios, el establecimiento de las interacciones efectivas del sistema PP con las superficies de la carne. Este hecho estaría relacionado, con la baja velocidad de ligazón de este sistema frente a la presentada por los otros sistemas utilizados (Tabla V.2). Sin embargo, una vez establecidas las uniones, las piezas cárnicas pudieron salarse, lo que indicaría la estabilidad de las interacciones una vez producidas. En el post-salado pudo apreciarse un incremento de la fuerza de ligazón, probablemente por la consolidación de las uniones y la pérdida de agua. El incremento de la fuerza de ligazón fue especialmente manifiesto en las primeras semanas de secado. Este sistema de ligazón fue el único que proporcionó elevadas fuerzas de ligazón sin tratamiento

previo de las superficies cárnicas, es decir, aplicándose sobre ellas directamente el preparado comercial sin preparación alguna. En conjunto, y como puede apreciarse en la Tabla V.2, fue el sistema de ligazón más versátil, en cuando a las condiciones de procesado.

Cabe añadir que las emulsiones cárnicas adicionadas con PP presentaron una leve capacidad de ligazón y se ha considerado un material adecuado para rellenar espacios en el interior de piezas cárnicas. Las fuerzas de ligazón alcanzadas fueron de hasta 2 N cm<sup>-2</sup> al final del tiempo de secado.

En el estudio de microscopía electrónica de barrido de los perniles reestructurados con los distintos sistemas de ligazón en frío, se apreciaron diferencias sustanciales entre las zonas de unión establecidas por FT y las creadas por los otros dos agentes. La imagen de la zona de unión con el sistema FT mostró una estructura gelificada que se ubicaba entre las superficies cárnicas, entre las que pudieron observarse estructuras fibrosas de interrelación. Comentarios similares han sido realizados por otros autores (Kahn y Cohen, 1981; Piette, 1999) en distintos usos del sistema FT. Cuando la ligazón fue promovida por la MTGasa o por el sistema PP, en la zona de unión se observó una red formada por el entrecruzamiento de estructuras fibrosas que interacciona con las superficies cárnicas. Esta estructura fue especialmente organizada y densa en el caso del sistema PP, lo que explicaría la mayor fuerza de ligazón.

En conjunto, todos los sistemas de ligazón en frío estudiados podrían utilizarse para la reestructuración de perniles en fresco para someterse a un proceso de salado y secado similar al requerido para la elaboración de jamón curado (Figura V.3). Cada uno presenta ventajas e inconvenientes por los que podrían elegirse o rechazarse. En el caso de la MTGasa y del sistema FT permiten la práctica simultánea de la ligazón y el salado, ahorrando tiempo y reduciendo la manipulación. Sin embargo, ambos requieren un tratamiento previo de las superficies cárnicas a unir y las fuerzas de ligazón alcanzadas son inferiores a las presentadas por el sistema PP. Los agentes de ligazón FT y PP son de origen porcino, por lo que su incorporación al producto cárnico no supone la adición de componentes ajenos a su composición. Después del análisis de todos ellos, cabe recomendar, para su aplicación a nivel industrial, el sistema PP por presentar considerables ventajas, como su fácil conservación (por ejemplo, el sistema FT debe mantenerse congelado hasta su uso) y no requerir una preparación previa (por ejemplo, el sistema FT ha de mezclarse inmediatamente antes de su uso). Este sistema,

además, puede aplicarse sobre superficies cárnicas sin tratar o tratadas con soluciones salinas si se quiere favorecer la estabilidad microbiológica del producto reestructurado.



**Figura V.3.** Fotografía de un pernil reestructurado, salado y seco.  
(La imagen corresponde a un producto elaborado con un concentrado de proteínas de plasma sanguíneo, Plasma Powder FG Porcine).

*Al final de esta tesis cabe indicar que se considera que se han obtenido resultados de interés científico, con los que se intenta contribuir al conocimiento científico y tecnológico en los distintos campos estudiados, al plantear propuestas de posible aplicación industrial como es la elaboración de jamón deshuesado reestructurado. Para un trabajo futuro debería realizarse el ensayo a escala industrial.*



## *VI. CONCLUSIONES*





## VI. CONCLUSIONES

1. La variabilidad de las características reológicas de los productos cárnicos comerciales puede modelarse matemáticamente para definir perfiles de textura dependiendo de su estructura, morfología y propiedades físico-químicas.
2. La variabilidad de la resistencia a la ruptura de los músculos y de la grasa subcutánea de los jamones curados comerciales puede ajustarse al modelo de distribución de Weibull, que permite predecir su probabilidad de ruptura de distintas porciones o cortes de este producto.
3. Productos derivados del plasma sanguíneo, como el sistema binario fibrinógeno – trombina y concentrados deshidratados de proteínas enriquecidos en fibrinógeno pueden utilizarse para la gelificación en frío de emulsiones cárnicas. Los geles obtenidos sin adición de sal están formados por el entrecruzamiento de componentes proteicos que originan una red tridimensional porosa y con elevado contenido de agua ligada. Estas estructuras son elásticas y presentan una resistencia similar a la de los geles cárnicos obtenidos por calentamiento. La adición de sal reduce la estabilidad mecánica de estos geles, su porosidad y agua ligada y se incrementa su adhesividad.
4. La transglutaminasa de origen microbiano establece interacciones estables entre superficies cárnicas que perduran durante procesos tales como el salado y el secado. Las interacciones se potencian tratando previamente las superficies cárnicas con una mezcla de sales (NaCl, KNO<sub>3</sub> y NaNO<sub>2</sub>).
5. El sistema fibrinógeno - trombina de origen porcino permite la reestructuración de pernils deshuesados destinados a la elaboración de jamón curado. El proceso es viable aplicando mezclas de fibrinógeno-trombina (10/1, v/v) en las superficies cárnicas previamente tratadas con solución salina (NaCl, KNO<sub>3</sub> y NaNO<sub>2</sub>). La conformación de las piezas cárnicas debe realizarse durante los primeros 15 minutos tras la mezcla de fibrinógeno y trombina.
6. El envasado a vacío de los pernils deshuesados cubiertos de sal permite simultanear los procesos de unión y salado cuando se utiliza transglutaminasa de

origen microbiano o el sistema fibrinógeno-trombina como agentes de ligazón en frío. Este procedimiento permite reducir la manipulación y el tiempo de procesamiento de las piezas cárnicas.

7. Preparados deshidratados de plasma sanguíneo de origen porcino enriquecidos en fibrinógeno pueden utilizarse para la reestructuración de perniles deshuesados destinados a la elaboración de jamón curado sin que sea necesario un tratamiento previo de las superficies cárnicas.
8. El empleo de agentes de ligazón en frío (transglutaminasa de origen microbiano y derivados de plasma sanguíneo) proporcionan fuerzas de unión entre las superficies cárnicas tratadas, en el intervalo de las requeridas para la rotura de tejidos íntegros de jamón curado, lo que asegura su integridad en distintas operaciones comerciales como el loncheado.

### **Conclusión general**

Entre todos los sistemas ensayados para la producción industrial de jamón curado a partir de perniles deshuesados, se recomienda el uso de preparados deshidratados de plasma sanguíneo enriquecidos en fibrinógeno debido a que puede aplicarse directamente en las superficies cárnicas y proporciona las uniones de mayor intensidad. Adicionalmente, es un preparado muy estable y de fácil manejo.

## VII. BIBLIOGRAFÍA



## VII. BIBLIOGRAFÍA

- [ISO] International Organization for Standardization. 1981a. Analyse sensorielle. Guide pour l'implantation d'un local destiné aux analyses sensorielles. ISO/DP 66.58, Genève:ISO.
- Abd El-Salam, M. H., El-Shibiny, S., & Salem, A. (2009). Factors affecting the functional properties of whey protein products: A review. *Food Reviews International*, 25, (3), 251–270.
- ABMPS. (1981). Examination of flavor and color changes in NLABS progress for flaked and formed meats. Report 119. *Committee on Food Stability, Advisor Board on Military Personnel Supplies, National Research Council*.
- Aboumahmoud, R., & Savello, P. (1990). Crosslinking of whey proteins by transglutaminase. *Journal of Dairy Science*, 73 (2), 256–263.
- Aeschlimann, D., & Paulsson, M., (1994). Transglutaminases: protein cross-linking enzymes in tissues and body fluids. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 71 (4), 402–415.
- Aguilera, J. M., & Stanley, D. W. (1993). The microstructure of food protein assemblies. *Food Reviews International*, 9 (4), 527–550.
- Allen Foegeding, E., Brown, J., Drake, M., & Daubert, C. R. (2003). Sensory and mechanical aspects of cheese texture. *International Dairy Journal*, 13, (8), 585-591.
- Allison, A. C. (1974). Structure and function of plasma proteins. *Plenum Publishing Company Ltd*. Vol. 1.
- Álvarez de la Puente, J. (2003). International trade of cured ham: promotion and barriers. *II World Congress of Dry Cured Ham*. International Commerce Plenary Session conferences. Cáceres, Spain.
- Álvarez, C., Bances, M., Rendueles & Díaz, M. (2009). Functional properties of isolated porcine blood proteins. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 807–814.

- Ando, H., Adachi, M., Umeda, K., Matsuura, A., Nonaka, M., Uchio, R., Tanaka, H., & Motoki, M. (1989). Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganism. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53 (10), 2613–2617.
- Ando, H., Matsura, A., & Susumu, H. (1992). Manufacture of transglutaminase with *Streptomyces*. *Japanese Kokai Tokkyo Koho, JP 04108381*.
- Andrés, A., Cava, R., Ventanas, J., Thovar, V., & Ruiz, J. (2004). Sensory characteristics of Iberian ham: Influence of salt content and processing conditions. *Meat Science*, 68, 45–51.
- Ankerson, J., Birkbeck, A.E., Thomson, R.D., & Vanezis, P. (1999). Puncture resistance and tensile strength of skin simulants. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: *Journal of Engineering in Medicine*, 213, 493–501.
- AOAC (1995). Official methods of analysis (16<sup>th</sup> ed.). Washington, DC, USA: Association of Official Analytical Chemists, Inc.
- Arnau, J. (1993). Tecnología de elaboración del jamón curado. *Microbiología SEM*, 9, 3–9.
- Arnau, J., Guerrero, L., Casademont, G., & Gou, P. (1995). Physical and chemical changes in different zones of normal and PSE dry cured ham during processing. *Food Chemistry*, 52 (1), 63–69.
- As, H. V., & Lens, P. (2001). Use of <sup>1</sup>H-NMR to study transport processes in porous biosystems. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 26, 43–52.
- Ashwini, A., Jyotsna, R., & Indrani, D. (2009). Effect of hydrocolloids and emulsifiers on the rheological, microstructural and quality characteristics of eggless cake. *Food Hydrocolloids*, 23, 700–707.
- Asquith, R. S., Otterburn, M., & Sinclair, W. J. (1974). Isopeptide crosslinks: their occurrence and importance in protein structure. *Angewandte Chemie, International Edition England*, 13, 514–520.
- Association of Official Analytical Chemists. (1995). Salt (Chlorine as Sodium Chloride) in Meat. 935.47. Official methods of analysis (15<sup>th</sup> edition). Gaithersburg. Maryland.

- Association of Official Analytical Chemists. (2006). Association of Official Analytical Chemists, (18<sup>th</sup> ed.). Washington DC.
- Atkins A. G. & Mai, Y. W. (1985) Elastic and plastic fracture: Metals, polymers, ceramics, composites, biological materials. Ellis Horwood, London, UK
- Attenburrow, G. E. (1993) The rheology of leather – a review. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 77, 107–114.
- Autio, K., Lyytikäinen, H., Mälkki, Y., & Kanko, S. (1985). Penetration studies of blood globin gels. *Journal of Food Science*, 50, 615–617.
- Babu, A. S., & Jayabalan, V. (2009). Weibull probability model for fracture strength of Aluminium (1101)-Alumina particle reinforced metal matrix composite. *Journal of Materials Science & Technology*, 25 (3), 341.
- Barbetta, A., Massimi, M., Devirgiliis, L. C., & Dentini, M. (2006). Enzymatic crosslinking versus radical polymerization in the preparation of gelatin polyHIPEs and their performance as scaffolds in the culture of hepatocytes. *Biomacromolecules* 7 (11), 3059–3068.
- Barboza de M., Y., Márquez S., E., Arias de M., B., Faría, J., & Castejón, O. (1994). Utilización de plasma sanguíneo de bovino como fuente proteica en la formulación de un medio de cultivo para lactobacilos. *Revista Científica, FCV-Luz*, Vol. IV, nº 1, 55–59.
- Barbut, S. (2006). Effects of caseinate, whey and milk powders on the texture and microstructure of emulsified chicken meat batters. *LWT-Food Science and Technology*, 39 (6), 660–664.
- Bardón, R., Cruz, M., Fúster, F., Gómez, J. V., Marino, E., & Ribes, M. A. (2012). Estudio de mercado de los productos cárnicos comercializados en la Comunidad de Madrid. Ed. Dirección General de Ordenación e Inspección. Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid.
- Barker, B. P., Mies, W. L., Turner, J. W., Lunt, D. K., & Smith, S. B. (1995) Influence or production system on carcass characteris of F1 Wagyu x Angus steers and heifers. *Meat Science*, 41, 1–5.



- Barnes, R. N., Bungay, P. J., Elliott, B. M., Walton, P. L., & Griffin, M. (1985). Alterations in the distribution and activity of transglutaminase during tumour growth and metastasis. *Carcinogenesis*, 6 (3), 459–463.
- Barrett, A. J., Rawlings, N. D., & Woessner, J. F. (2004). Thrombin. In: *Handbook of proteolytic enzymes*. 2<sup>nd</sup> Edition, vol. 2, Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp. 1667–1672.
- Barroso Herrero, S., Gil Bercero, J. R., & Camacho López, A. M. (2008). *Introducción al conocimiento de los materiales y a sus aplicaciones*. Editorial UNED. (1<sup>a</sup> ed.). Universidad Nacional de Educación a Distancia.
- Bee, G., Solomon, M.B., Czerwinski, S.M., Long, C, Pursel, V.G. (1999). Correlation between histochemically assessed fiber type distribution and isomyosin and myosin heavy chain content in porcine skeletal muscles. *Journal Animal Science*, 77, 2104-2111.
- Begin, F., Santizo, M. C., Peerson, J. M., Torun, B., & Brown, K. H. (2007). Effects of bovine serum concentrate, with or without supplemental micronutrients, on the growth, morbidity, and micronutrient status of young children in a low-income, peri-urban Guatemalan community. *European Journal of Clinical Nutrition*, 62, (1), 39–50.
- Begin, F., Santizo, M-C., Peerson, J.M., Torún, B., & Brown, K.H. (2008). Effects of bovine serum concentrate, with or without supplemental micronutrients, on the growth, morbidity, and micronutrient status of young children in a low-income, peri-urban Guatemalan community. *European Journal of Clinical Nutrition*, 62, 39–50.
- Belhocine, D., Mokrane, H., Grib, H., Lounici, H., Pauss, A., & Mameri, N. (2000). Optimization of enzymatic hydrolysis of haemoglobin in a continuous membrane bioreactor. *Chemical Engineering Journal*, 76 (3), 189–196.
- Beltrán-Lugo, A. I., Maeda-Martínez, A. N., Pacheco-Aguilar, R., Nolasco-Soria, H. G., & Ocaño-Higuera, V. M. (2005). Physical, textural, and microstructural properties of restructured adductor muscles of 2 scallop species using 2 cold-binding systems. *Journal of Food Science*, 70 (2), E78–E84.

- Benjakul, S., Visessanguan, W., & Chantarasuwan, C. (2004). Effect of porcine plasma protein and setting on gel properties of surimi produced from fish caught in Thailand. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 37, 177–185.
- Bernal, V. M., Smajda, C. H., Smith, J. L., & Stanley, D. W. (1987). Interactions in protein/polysaccharide/calcium gels. *Journal of Food Science*, 52 (5), 1121–1125.
- Bertram, H. C., & Andersen, H. J. (2004). Applications of NMR in meat science. *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, 53, 157–202.
- Bertram, H. C., Karlsson, A. H., Rasmussen, M., Pedersen, O. D., Dønstrup, S., & Andersen, H. J. (2001). Origin of multiexponential T<sub>2</sub> relaxation in muscle myowater. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, (6), 3092–3100.
- Bertram, H. C., Kristensen, M., & Andersen, H. J. (2004). Functionality of myofibrillar proteins as affected by pH, ionic strength and heat treatment – A low-field NMR study. *Meat Science*, 68, 249–256.
- Bertram, H. C., Purslow, P. P., & Andersen, H. J. (2002). Relationship between meat structure, water mobility and distribution: A low-field nuclear magnetic resonance study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 824–829.
- Bertram, H. C., Whittaker, A. K., Shorthose, W. R., Andersen, H. J., & Karlsson, A. H. (2004). Water characteristics in cooked beef as influenced by ageing and highpressure treatment – An NMR micro imaging study. *Meat Science*, 66, 301–306.
- Bertram, H. C., Andersen, H. J., & Karlsson, A. H. (2001). Comparative study of low-field NMR relaxation measurements and two traditional methods in the determination of water holding capacity of pork. *Meat Science*, 57, 125–132.
- Binnie, C. G., & Lord, S. T. (1993). The fibrinogen sequences that interact with thrombin. *Blood*, 81, 3186–3192.
- Birckbichler, P. J., Orr, G. R., Conway, E., & Patterson, M. K. (1977). Transglutaminase activity in normal and transformed cells. *Cancer Research*, 37 (5), 1340–1344.
- Bird, R. B., Stewart, W. E., & Lightfoot, E. N. *Fenómenos de transporte*. Ed. Reverté, 1998, pp. 1–10.

- Bizzotto, C.A., Capobianco, M., & Silvestre, M. P. C. (2005). Evaluation of functional properties of a blood protein. *Pakistan Journal of Nutrition*, 4 (1), 11–16.
- Blombäck, B. & Bark, N. (2004). Fibrinopeptides and fibrin gel structure. *Biophysical Chemistry*, 112, 147–151.
- Blombäck, B. (1996). Fibrinogen and fibrin – proteins with complex roles in hemostasis and thrombosis. *Thrombosis Research*, 83, 1–75.
- Boles, J. A., & Shand, P. J. (1998). Effect of comminution method and raw binder system in restructured beef. *Meat Science*, 49 (3), 297–307.
- Boles, J. A., & Shand, P. J. (1999). Effects of raw binder system, meat cut and prior freezing on restructured beef. *Meat Science*, 53 (4), 233–239.
- Bonny, J. M., Laurent, W., Labas, R., Taylor, R., Berge, P., & Renou, J. P. (2000). Magnetic resonance imaging of connective tissue: A non-destructive method for characterising muscle structure. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 337–341.
- Borcherding, K., Lorenzen, P. Chr., Hoffmann, W., & Schrader, K. (2008). Effect of foaming temperature and varying time/temperature-conditions of preheating on the foaming properties of skimmed milk. *International Dairy Journal*, 18, 349–358.
- Borrero-López, O., Hoffman, M., Bendavid, A., & Martin, P. J. (2009). Reverse size effect in the fracture strength of brittle thin films. *Scripta Materialia*, 60 (11), 937–940.
- Boulby, P. A., & Rugg-Gunn, F. (2003). T<sub>2</sub>: The transverse relaxation time. In P. Tofts (Ed.), *Quantitative MRI of the brain. Measuring changes caused by disease* (pp. 143–173). West Sussex, England: John Wiley & Sons.
- Bourne, M. C. (1978). Texture profile analysis. *Food Technology*, 32, 62–72.
- Bourne, M. C. (1979). Rupture test vs small-strain test in predicting consumer response to texture. *Food Technology*, 33, 67–70.
- Bourne, M. C. (2002). *Food texture and viscosity: concept and measurement*. Academic Press, New York.

- Brandis, R. L. (1990). In *Handbook of Adhesives*, Skeist, I. Animal Glue. Pp. 123, Van Nostrand Reinhold Co., New York.
- Broderick, E. P., O'Halloran, D. M., Rochev, Y. A., Griffin, M., Collighan, R. J., & Pandit, A. S. (2005). Enzymatic stabilization of gelatin-based scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research part B*, 72 (1), 37–42.
- Brøndum, J., Byrne, D. V., Bak, L. S., Bertelsen, G., & Engelsen, S. B. (2000). Warmedover flavour in porcine meat-a combined spectroscopic, sensory and chemometric study. *Meat Science*, 54, 83–95.
- Brøndum, J., Munck, L., Henckel, P., Karlsson, A., Tornberg, E., & Engelsen, S. B. (2000). Prediction of water-holding capacity and composition of porcine meat with comparative spectroscopy. *Meat Science*, 55, 177–185.
- Brookhart, P. P., MaMahon, P. L., & Takahashi, M. (1983). Purification of guinea pig liver transglutaminase using a phenylalanine-Sepharose 4B affinity column. *Analytical Biochemistry*, 128 (1), 202–205.
- Brown, R. J. S., Capozzi, F., Claudio, C., Cremonini, M. A., Petracci, M., Placucci, G. (2000). Relationships between <sup>1</sup>H-NMR relaxation data and some technological parameters of meat: a chemometric approach. *Journal of Magnetic Resonance*, 147, 89–94.
- Bruna, J. M., Fernández, M., Hierro, E. M., Ordoñez, J. A., & de la Hoz, L. (2000). Combined use of pronase E and a fungal extract (*Penicillium aurantiogriseum*) to potentiate the sensory characteristics of dry fermented sausages. *Meat Science*, 54 (2), 135–145.
- Burnouf, T. (2007). Modern plasma fractionation. *Transfusion medicine reviews*, 21 (2), 101–117.
- Burrow, M. F., Thomas, D., Swain, M. V., & Tyas, M. J. (2004). Analysis of tensile bond strengths using Weibull statistics. *Biomaterials*, 25, (20), 5031–5035.
- Butkowski, R. J., Elion, J. A. C. Q. U. E. S., Downing, M. R., & Mann, K. G. (1977). Primary structure of human prethrombin 2 and alpha-thrombin. *Journal of Biological Chemistry*, 252 (14), 4942–4957.

- Caldironi, H. A., & Ockerman, H. W. (1982). Incorporation of blood proteins into sausage. *Journal of Food Science*, 47, 405–407.
- Cambero, M. I. (2001). Carnes reestructuradas. In Martín & Macías, *Enciclopedia de la carne y de los productos cárnicos Vol. II*. (pp. 1485–1508). Cáceres, España.
- Cambero, M. I., López, M. O., de la Hoz, L., & Ordóñez, J. A. (1991). Restructured meat. Composition and binding-properties. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 31 (3), 293–309.
- Campo, M.M., Santolaria, P., Sañudo, C., Lepetit, J., Olleta, J.L., Panea, B. Albertí, P. (2000). Assessment of breed type and ageing time effects on beef meat quality using two different texture devices. *Meat Science*, 55, 371–378.
- Candek-Potokar, M., Monin, G., & Zlender, B. (2002). Pork quality, processing and sensory characteristics of dry-cured hams as influenced by Duroc crossing and sex. *Journal of Animal Science*, 80, 988–996.
- Carballo, J., Ayo, J., & Colmenero, F. J. (2006). Microbial transglutaminase and caseinate as cold set binders: Influence of meat species and chilling storage. *LWT-Food Science and Technology*, 39 (6), 692–699.
- Carretero, C., & Parés, D. (2000). Improvement of the microbiological quality of blood plasma for human consumption purposes. *Recent Research Developments in Agricultural & Food Chemistry*, 4, 203–216.
- Causton, D. R., & Venus, J. C. (1981). *The biometry of plant growth*. London: Edward Arnold Ltd.
- Cernadas, E., Carrion, P., Rodríguez, P. G., Muriel, E., & Antequera, T. (2005). Analyzing magnetic resonance images of Iberian pork loin to predict its sensorial characteristics. *Computer Vision and Image Understanding*, 98, 344–360.
- Chan, E., Ng, M., Peng, H.W., & Chua, L. (2001). Beef plasma in processed meats. *Asia Pacific Food Industry*, 13, 40–44.
- Chau, D. Y. S., Collighan, R. J., Verderio, E. A. M., Addy, V. L., & Griffin, M. (2005). The cellular response to transglutaminase crosslinked collagen. *Biomaterials*, 26 (33), 6518–6529.

- Cheftel, J. C., Cuq, J. L., & Lorient, D. (1989). *Proteínas Alimentarias*. Editorial Acribia, S.A.
- Chen, H. H., Xu, S. Y., & Wang, Z. (2007). Interaction between flaxseed gum and meat protein. *Journal of Food Engineering*, 80, 1051–1059.
- Chen, J. S. K., & Mehta, K. (1999). Tissue transglutaminase: an enzyme with a split personality. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 31 (8), 817–836.
- Chen, M. J. & Lin, C. W. (2002). Factors affecting the water-holding capacity of fibrinogen/plasma protein gels optimized by response surface methodology. *Journal of Food Science*, 67, 2579–2582.
- Chen, X. Guo, Q. & Mi, Y. (1998). Bamboo fiber-reinforced polypropylene composites: A study of the mechanical properties *Journal of Applied Polymer Science*, 69, 1891–1899.
- Cheng, Q., Sun D. W., & Scannell, A. G. M. (2005). Feasibility of water cooking for pork ham processing as compared with traditional dry and wet air cooking methods. *Journal of Food Engineering*, 67, 427–433.
- Cheryan, M. (1998). *Ultrafiltration and microfiltration handbook*. CRC press.
- Chou D. H., & Morr C. V. (1979). Protein-water interactions and functional properties. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56, 53–56.
- Christensen, M., Kok, C., & Ertbjerg, P. (2006). Mechanical properties of type I and type IIB single porcine muscle fibres. *Meat Science*, 73 (3), 422–425.
- Christensen, M., Purslow, P. P., & Larsen, L. M. (2000). The effect of cooking temperature on mechanical properties of whole meat, single muscle fibres and perimysial connective tissue. *Meat Science*, 55, 301–307.
- Christensen, M., Young, R. D., Lawson, M. A., Larsen, L. M., & Purslow, P. P. (2003). Effect of added (l-calpain and post-mortem storage on the mechanical properties of bovine single muscle fibres extended to fracture. *Meat Science*, 66, 105–112.
- Chung, S. I., Lewis, M. S., & Folk, J. E. (1974). Relationships of the catalytic properties of human plasma and platelet transglutaminase (activates blood coagulation factor XIII) to their subunit structures. *Journal of Biological Chemistry*, 249, 940–950.

- Clarke, D. D., Mycek, M. J., Neidle, A., & Waelsch, H. (1959). The incorporation of amines into proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 79, 338–354.
- Cofrades, S., Guerra, M. A., Carballo, J., Fernández-Martín, F., & Jiménez Colmenero, F. (2000). Plasma protein and soy fiber content effect on bologna sausage properties as influenced by fat level. *Journal of Food Science*, 65 (2), 281–287.
- Cofrades, S., López-López, I., Ruiz-Capillas, C., Triki, M., & Jiménez-Colmenero, F. (2011). Quality characteristics of low-salt restructured poultry with microbial transglutaminase and seaweed. *Meat Science*, 87 (4), 373–380.
- Cohn, E. J., Gurd, F. R. N., Surgenor, D. M., Barnes, B. A., Brown, R. K., Derouaux, G., & Uroma, E. (1950). A System for the separation of the components of human blood: quantitative procedures for the separation of the protein components of human plasma 1a, b, c. *Journal of the American Chemical Society*, 72 (1), 465–474.
- Colmenero, F. J. (1996). Technologies for developing low-fat meat products. *Trends in Food Science & Technology*, 7 (2), 41–48.
- CONFECARNE- ANICE (Asociación Nacional de Industrias de la Carne de España). 2013.
- Cortez, J., Bonner, P. L. R., & Griffin, M. (2004). Application of transglutaminases in the modification of wool textiles. *Enzyme and Microbial Technology*, 34 (1), 64–72.
- Costa, M. D. R., Bergamin Filho, W., Silveira, E. T. F., & Felício, P. E. D. (2008). Colour and texture profiles of boneless restructured dry-cured hams compared to traditional hams. *Scientia Agricola (Piracicaba, Braz.)*, 65 (2), 169–173.
- Crenwelge, D. D., Dill, C. W., Tybor, P. T., Landmann, W. A. (1974). A comparison of the emulsification capacities of some protein concentrates. *Journal of Food Science*, 39, 175–177.
- Cui, L., Du, G., Zhang, D., Liu, H., & Chen, J. (2007). Purification and characterization of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygroscopicus*. *Food Chemistry*, 105 (2), 612–618.
- Cutter, C. N., & Siragusa, G. R. (1998). Incorporation of nisin into a meat binding system to inhibit bacteria on beef surfaces. *Letters in Applied Microbiology*, 27, 19–23.

- Date, M., Yokoyama, K., Umezawa, Y., Matsui, H., & Kikuchi, Y. (2003). Production of native-type *Streptovorticillium mobaraense* transglutaminase in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (5), 3011–3014.
- Davies, D. G. S. (1973). The statistical approach to engineering design in ceramics. *Proceedings of the Britain Ceramic Society*, 22, 429–452.
- Dàvila, E., Parés, D., & Howell, N. K. (2006). Fourier transform Raman spectroscopy study of heat-induced gelation of plasma proteins as influenced by pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (20), 7890–7897.
- Dàvila, E., Parés, D., Cuvelier, G., & Relkin, P. (2007). Heat-induced gelation of porcine blood plasma proteins as affected by pH. *Meat Science*. 76 (2), 216–255.
- Dàvila, E., Saguer, E., Toldrà, M., Carretero, C., & Parés, D. (2007). Surface functional properties of blood plasma protein fractions. *European Food Research and Technology*, 226 (1-2), 207-214.
- Dàvila, E., Toldrà, M., Saguer, E., Carretero, C., & Parés, D. (2007c). Characterization of plasma protein gels by means of image analysis. *LWT – Food Science and Technology*, 40 (8), 1321–1329.
- De Freitas, Z., Sebranek, J. G., Olson, D. G., & Carr, J. M. (1977). Carrageenan effects on salt-soluble meat proteins in model systems. *Journal of Food Science*, 62, 539–543.
- De la Hoz, L., Cambero, M. I., Cabeza, M. C., Herrero, A. M. & Ordóñez J. A. (2008). Elimination of *Listeria monocytogenes* from vacuum-packed dry-cured ham by E-beam irradiation. *Journal of Food Protection*, 71, 2001–2006.
- De la Hoz, L., D'Arrigo, M., Cambero, M. I., & Ordoñez, J. A. (2004). Development of an n-3 fatty acid and  $\alpha$ -tocopherol enriched dry fermented sausage. *Meat Science*, 67 (3), 485–495.
- De Spirito, M., Arcóvito, G., Papi, M., Rocco, M., & Ferri, F. (2003). Small and wide-angle elastic light scattering study of fibrin structure. *Journal of Applied Crystallography*, 36, 636–641.



- Del Duca, S., Beninati, S., & Serafini-Fracassini, D. (1995). Polyamines in chloroplasts: identification of their glutamyl and acetyl derivatives. *Biochemical Journal*, 305, 233–237.
- Del Hoyo, P., Moure, F., Rendueles, M., & Diaz, M. (2007). Demineralization of animal blood plasma by ion exchange and ultrafiltration. *Meat Science*, 76 (3), 402–410.
- Delaney, R. A. M. (1975). The nutritive value of porcine blood plasma concentrates prepared by ultrafiltration and spray drying. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 26, (3), 303–310.
- Desmond, E. (2006). Reducing salt: A challenge for the meat industry. *Meat Science*, 74, (1), 188–196.
- Desmond, E. M., & Kenny, T. A. (2005). Effect of pelvic suspension and cooking method on the processing and sensory properties of hams prepared from two pork muscles. *Meat Science*, 69, (3), 425–431.
- Desmond, E. M., Kenny, T. A., Ward, P., & Sun D. W. (2000). Effect of rapid and conventional cooling methods on the quality of cooked ham joints. *Meat Science*, 56, 271–277.
- Di Stasio, E., Nagaswami, C., Weisel, J. W., & Di Cera, E. (1998).  $\text{Cl}^-$  regulates the structure of the fibrin clot. *Biophysical Journal*, 75, (4), 1973–1979.
- Dickinson, E. (1997). Enzymic crosslinking as a tool for food colloid rheology control and interfacial stabilization. *Trends in Food Science and Technology*, 8, 334–339.
- Dieterich, W., Ehnis, T., Bauer, M., Donner, P., Volta, U., Riecken, E. O., & Schuppan, D. (1997). Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nature Medicine*, 3 (7), 797–801.
- Dimitrakopoulou, M. A., Ambrosiadis, J. A., Zetou, F. K., & Bloukas, J. G. (2005). Effect of salt and transglutaminase (TG) level and processing conditions on quality characteristics of phosphate-free, cooked, restructured pork shoulder. *Meat Science*, 70 (4), 743–749.

- Dirikolu, M. H., & Aktaş, A. (2002). Statistical analysis of fracture strength of composite materials using Weibull distribution. *Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences*, 26 (1), 45–48.
- Dodson, B. (1994). *Weibull analysis*. Milwaukee, WI: ASQC Quality Press.
- Dondero, M., Figueroa, V., Morales, X., & Curotto, E. (2006). Transglutaminase effects on gelation capacity of thermally induced beef protein gels. *Food Chemistry*, 99 (3), 546–554.
- Donnelly, T. H., Laskowski, M. Jr., Notley, N., & Scheraga, H. A. (1955). Equilibria in the fibrinogen-fibrin conversion: II. Reversibility of the polymerization steps. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 56, 369–387.
- Dransfield, E., (1977). Intramuscular composition and texture of beef muscles. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28 (9), 833–842.
- Duxbury, P. M., & Leath, P. L. (1987). The failure distribution in percolation models of breakdown. *Journal of Physics A: Mathematical and General*, 20, (6), L411.
- Elizalde, I. (2008). El jamón español se prepara para hablar mandarín. *Expansión, Edición impresa*. March 25.
- Ensor, S. A., Sofos, J. N., & Schmidt, G. R. (1990). Effects of connective tissue on algin restructured beef. *Journal of Food Science*, 55 (4), 911–914.
- Enzyme Nomenclature (1992). *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, p. 201, Academic Press, Inc.
- European Commission (2006). Council Regulation (EC) N° 510/2006 of 20 March 2006 on the protection of geographical indications and designations of origin for agricultural products and foodstuffs. *Official Journal of European Union of 31.3.2006*, L93, 12–25.
- European Commission (EC). (1999). Commission Regulation (EC) N°. 2419/1999 of 12 November 1999 supplementing the Annex to Regulation (EC) N°. 2301/97 on the entry of certain names in the Register of certificates of specific character provided for in Council Regulation (EEC) N°. 2082/92 on certificates of specific character for

- agricultural products and foodstuffs. *Official Journal of the European Communities*, of 13.11.1999, L291, 25–26.
- European Commission. (1996). Commission Regulation (EC) N°. 1107/96 of 12 June 1996 on the registration of geographical indications and designations of origin under the procedure laid down in Article 17 of Council Regulation (EEC) N°. 2081/92. *Official Journal of the European Communities*, L148, 1–15.
- European Commission. (1999). Commission Regulation (EC) N°. 2419/1999 of 12 November 1999 supplementing the Annex to Regulation (EC) N°. 2301/97 on the entry of certain names in the Register of certificates of specific character provided for in Council Regulation (EEC) N°. 2082/92 on certificates of specific character for agricultural products and foodstuffs. *Official Journal of the European Communities*, L291, 25–26.
- European Food Safety Authority (EFSA). (2005). Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to the use of an enzyme preparation based on thrombin:fibrinogen derived from cattle and/or pigs as a food additive for reconstituting food. *The EFSA Journal*, (2005), 214, p. 1.
- Færgemand, M., Murray, B. S., & Dickinson, E. (1997). Crosslinking of milk proteins with transglutaminase at the oil-water interface. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (7), 2514–2519.
- Falcone, P., Serafini-Fracassini, D., & Del Duca, S. (1993). Comparative studies of transglutaminase activity and substrates in different organs of *Helianthus tuberosus*. *Journal of Plant Physiology*, 142 (3), 263–273.
- Fang, S. H., Nishimura, T. & Takahashi, K. (1999). Relationship between development of intramuscular connective tissue and toughness of pork during growth of pigs. *Journal of Animal Science*, 77 (1), 120–130.
- Fantazzini, P., Gombia, M., Schembri, P., Simoncini, N., & Virgili, R., (2009). Use of magnetic resonance imaging for monitoring Parma dry-cured ham processing. *Meat Science*, 82 (2), 219–227.

- FAO/WHO. (1985). Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Energy and Protein Requirement. Geneva, Switzerland.
- Farouk, M. M., Hall, W. K., Harrison, M., & Swan, J. E. (1999). Instrumental and sensory measurement of beef patty and sausage texture. *Journal of Muscle Foods*, 10, 17–28.
- Farouk, M. M., Zhang, S. X., & Waller, J. (2005). Meat spaghetti tensile strength and extensibility as indicators of the manufacturing quality of thawed beef. *Journal of Food Quality*, 28, 452–466.
- Feeney, R. E., & Whitaker, J. R. (1987). Importance of cross-linking reactions in proteins. *Advances in Cereal Science and Technology*, 9, 21–43.
- Fellows, P. (2000). *Food processing technology: principles and practice*. New York: Cork. CRC Press.
- Fennema O. R. (1993). *Food chemistry*. (2<sup>nd</sup> ed.). New York: Marcel Dekker Inc.
- Fernández, A., Díaz, M., & Rodrigues, A. (1995). Kinetic mechanisms in ion exchange processes. *The Chemical Engineering Journal and The Biochemical Engineering Journal*, 57 (1), 17–25.
- Fernández, M., Ordóñez, J. A., Cambero, M. I., Santos, C., Pin, C. & de la Hoz, L. (2007). Fatty acid compositions of selected varieties of Spanish dry ham related to their nutritional implications. *Food Chemistry*, 101, 107–112.
- Fernandez, X., Monin, G., Talmant, A., Mourot, J., & Lebret, B. (1999). Influence of intramuscular fat content on the quality of pig meat—1. Composition of the lipid fraction and sensory characteristics of *m. longissimus lumborum*. *Meat Science*, 53, (1), 59–65.
- Fesus, L., Madi, A., Balajthy, Z., Nemes, Z., & Szondy, Z. (1996). Transglutaminase induction by various cell death and apoptosis pathways. *Experientia*, 52 (10–11), 942–949.
- Finlay, B. (1969). Scanning electron microscopy of the human dermis under uni-axial strain. *Biomedical Engineering*, 4, (7), 322–327.
- Flores, N. C., Boyle, E. A. E., & Kastner, C. L. (2007). Instrumental and consumer evaluation of pork restructured with ACTIVA (TM) or with Fibrimex (TM)

- formulated with and without phosphate. *Lwt-Food Science and Technology*, 40, 179–185.
- Florido Rodríguez, J. L. (2006). Procedimiento para la recogida y transformación de la sangre en una proteína hidrolizada a partir de sangre de animales de abasto obteniéndose Proteína Hidrolizada de la Sangre (PHS). *Patent Number(s): ES 200601905*.
- Foegeding, E. A., Brown, J., Drake, M. A., Daubert, C. R. (2003). Review. Sensory and mechanical aspects of cheese texture. *International Dairy Journal*, 13, 585–591.
- Folk, I. E., & Finlayson, J. S. (1977). The  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine crosslink and the catalytic role of transglutaminase. *Advances in Protein Chemistry*, 31, 1–133.
- Folk, J. E. (1980). Transglutaminases. *Annual review of biochemistry*, 49 (1), 517–531.
- Food and Drug Administration (FDA). (2013). U.S. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnNavigation.cfm?filter=transglutaminase&sortColumn=&rpt=grasListing> . Pagina consultada 31/05/2013.
- Fort, N., Carretero, C., Parés, D., Toldrá, M., & Saguer, E. (2007). Combined treatment of porcine plasma with microbial transglutaminase and cysteine: effects on the heat-induced gel properties. *Food Hydrocolloids*, 21 (3), 463–471.
- Fort, N., Kerry, J. P., Carretero, C., Kelly, A. L., & Saguer, E. (2009). Cold storage of porcine plasma treated with microbial transglutaminase under high pressure. Effects on its heat-induced gel properties. *Food Chemistry*, 115 (2), 602–608.
- Foschi, R. O., & Barrett, J. D. (1976). Longitudinal shear strength of Douglas-fir. *Canadian Journal of Civil Engineering*, 3, (2), 198–208.
- Fox, J. B. (1980). Diffusion of chloride, nitrite, and nitrate in beef and pork. *Journal of Food Science*, 45, (6), 1740–1744.
- Fratzl, P., Misof, K., Zizak, I., Rapp, G., Amenitsch, H., & Bernstorff, S. (1998). Fibrillar structure and mechanical properties of collagen. *Journal of Structural Biology*, 122, (1), 119–122.
- García Páez, J. M., Jorge Herrero, E., Carrera Sanmartín, A., Millan, I., Cordon, A., Martín Maestro, M., Rocha, A., Arenaz, B., & Castillo-Olivares, J. L. (2003). Comparison of

- the mechanical behaviors of biological tissues subjected to uniaxial tensile testing: pig, calf and ostrich pericardium sutured with Gore-Tex. *Biomaterials*, 24 (9), 1671–1679.
- García, M. L., Cáceres, E., & Selgas, M. D. (2006). Effect of inulin on the textural and sensory properties of mortadella, a Spanish cooked meat product. *International Journal of Food Science and Technology*, 41 (10), 1207–1215.
- García-Garrido, J. A., Quiles-Zafra, R., Tapiador, J., Luque de Castro, M. D. (2000). Activity of cathepsin B, D, H and L in Spanish dry-cured ham of normal and defective texture. *Meat Science*, 56 (1), 1–6.
- Gatnau, R., Polo, J., & Robert, E. (2001). Plasma protein antimicrobial substitution at negligible risk. *Feed manufacturing in the Mediterranean region. Improving safety: from feed to food*, 54, 141–150.
- Geay, Y., Bauchart, D., Hocquette, J. F., & Culioli, J. (2001). Effect of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. *Reproduction Nutrition Development*, 41 (1), 1–26.
- Gennadios, A., Hanna, M.A., & Kurth, L.B. (1997). Application of edible coatings on meats, poultry and seafoods: a review. *LWT-Food Science and Technology*, 30 (4), 337–350.
- Gentleman, E., Lay, A. N., Dickerson, D. A., Nauman, E. A., Livesay, G. A., & Dee, K. C. (2003). Mechanical characterization of collagen fibers and scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 24 (21), 3805–3813.
- Gentry, P. A. (2004). Comparative aspects of blood coagulation. *The Veterinary Journal*, 168 (3), 238–251.
- Gerber, U., Jucknischke, U., Putzien, S., & Fuchsbauer, H. L. (1994). A rapid and simple method for the purification of transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*. *Biochemistry Journal*, 299 (Pt 3), 825–829.
- Gerrard, D. E., & Grant, A. L. (2003). *Principles of animal growth and development*, Kendall/Hunt Publishing.

- Gerrard, J. A. (2002). Protein-protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. *Trends in Food Science and Technology*, 13, 391–399.
- Gerrard, J. A., & Sutton, K. H. (2005). Addition of transglutaminase to cereal products may generate the epitope responsible for celiac disease. *Trends in Food Science and Technology*, 16 (11), 510–512.
- Geun-PyoHong, S. H. K., & Cho, M. J. (2008). Effect of glucono-d-lactone and j-carrageenan combined with high pressure treatment on the physico-chemical properties of restructured pork. *Meat Science*, 79, 236–243.
- Ghavimi, B., Althen, T. G., & Rogers, R. W. (1987). Effects of tumbling at various speeds on some characteristics of restructured cured beef. *Journal of Food Science*, 52, 543–553.
- Ghosh, A., (1999). A FORTRAN Program for fitting Weibull distribution and generating samples. *Computers and Geosciences*, 25 (7), 729–738.
- Gianfrani, C., Siciliano, R. A., Facchiano, A. M., Camarca, A., Mazzeo, M. F., Costantini, S., Salvati, V. M., Maurano, F., Mazzarella, G., Iaquinto, G., Bergamo, P., & Rossi, M. (2007). Transamidation of wheat flour inhibits the response to gliadin of intestinal T cells in celiac disease. *Gastroenterology*, 133 (3), 780–789.
- Giese, J. (1996). Fats, oils and fat replacers. *Food Technology*, 50, 78–83.
- Gimeno, O., Ansorena, D., Astiasarán, I., & Bello, J. (2000). Characterization of chorizo de Pamplona: Instrumental measurements of colour and texture. *Food Chemistry*, 69 (2), 195–200.
- Glaser, L. A., Paulson, A. T., Speers, R. A., Yada, R. Y., & Rousseau, D. (2007). Foaming behavior of mixed bovine serum albumin–protamine systems. *Food Hydrocolloids*, 21 (4), 495–506.
- Glicksman, M. [Ed.]. (1982). *Food hydrocolloids* (Vol. 1). Boca Raton, FL: Crc Press.
- Goldsack, N. R., Chambers, R. C., Dabbagh, K., & Laurent, G. J. (1998). Thrombin. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 30, 641–646.
- Goldsmith, R., & de Filippi, R. P. (1971). Industrial ultrafiltration in membrane processes in industry and biomedicine. London: Ed Plenum Press.

- Goodman, J., Lotti, M., Portoghese, P., Wagner, B., Weil, C. S., & Bernard, B. K. (1998). *Transglutaminase GRAS Certificate Expanded Use - Dairy and Meat Analog*.
- Gootenberg, J. E. (1998). Factor concentrates for the treatment of factor XIII deficiency. *Current Opinion in Hematology*, 5 (6), 372–375.
- Gordon, A., & Barbut, S. (1992). Mechanisms of meat batter stabilization: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32, 299–332.
- Gordon, J. E. (2009). *Structures: or why things don't fall down*. Da Capo Press.
- Gou, P., Comaposada, J., & Arnau, J. (2004). Moisture diffusivity in the lean tissue of dry-cured ham at different process times. *Meat Science*, 67 (2), 203–209.
- Gowland, P. A., & Stevenson, V. L. (2003).  $T_1$ : the longitudinal relaxation time. In *Quantitative MRI of the Brain. Measuring Changes Caused by Disease*, Tofts, P., Ed., Wiley: West Sussex, U.K., pp 111–143.
- Gras, J. (1956). Proteínas plasmáticas. *Editorial Jims*. Barcelona.
- Griffin, M., Casadio, R., & Bergamini, C.M. (2002). Review. Transglutaminases: Nature's biological glues. *Biochemical Journal*, 368, 377–396.
- Griffin, M., Smith, L. L., & Wynne, J. (1979). Changes in transglutaminase activity in an experimental model of pulmonary fibrosis induced by paraquat. *British Journal of Experimental Pathology*, 60 (6), 653.
- Grossowicz, N., Wainfan, E., Borek, E., & Waelsch, H. (1950). The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagine. *Journal of Biological Chemistry*, 187 (1), 111–125.
- Guiheneuf, T. M., Parker, A. D., Tessier, J. J., & Hall, L. D. (1997). Authentication of the effect of freezing/thawing of pork by quantitative magnetic resonance imaging. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 35, S112–S118.
- Guiheneuf, T. M., Tessier, J. J., Herrod, N. J., & Hall, L. D. (1996). Magnetic resonance imaging of meat products: Automated quantitation of the NMR relaxation parameters of cured pork, by both bulk NMR and MRI methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 71, 163–173.



- Guzmán, J. C., Mcmillin, K. W., Bidner, T. D., Dugas-Sims, S., & Godber, J. S. (1995). Texture, color and sensory characteristics of ground beef patties containing bovine blood proteins. *Journal of Food Science*, 60, 657–660.
- Hagi, T., Misawa, K., Saito, S., Sakamoto, Y., Kadota, N., Toda, Y., & Yamazaki, N. (1992). Method for preparation of plasma powder and product thereof. *U.S. Patent No. 5145706*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Hall, P. W. (2001). Introduction: New ingredient technologies for further processed meat products. *IFT Annual Meeting-New Orleans, Louisiana*.
- Hallberg, L., Rossander-Hulthén, L., Brune, M., & Gleerup, A. (1993). Inhibition of haem-iron absorption in man by calcium. *British Journal of Nutrition*, 69 (2), 533-540.
- Hallinan, A. J. (1993). A review of the Weibull distribution. *Journal of Quality Technology*, 25, 85–93.
- Halliwell, B. (1988). Albumin – an important extra cellular antioxidant?. *Biochemical Pharmacology*, 37 (4), 569–571.
- Hamm, R. (1960). Biochemistry of meat hydration. *Advances in Food Research*, 10, 355.
- Hand, D., Perry, M. J., & Haynes, L. W. (1993). Cellular transglutaminases in neural development. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 11 (6), 709–720.
- Hanson, S. W. F., & Olley, J. (1963). Application of the Blight and Dyer method of lipid extraction to tissue homogenates. *Biochemical Journal*, 89, 101–120.
- Hargin, K. D. (1996). Authenticity issues in meat and meat products. *Meat science*, 43, 277-289.
- Haut, R. C. (1983). Age-dependent influence of strain rate on the tensile failure of rat-tail tendon. *Journal Biomechanical Engineering*, 105, 296–299.
- Hayden, H. W., Moffatt, W. G., & Wulff, J. (1967). The structure and properties of materials, Vol. III. Mechanical behaviour, pp. 2. Copyright© by John Wiley & Sons, New York, Reprinted by permission of John Wiley & Sons, Inc.
- Hermansson, A. M. (1982). Gel characteristics – structure as related to texture and water binding of blood-plasma gels. *Journal of Food Science*, 47 (6), 1965–1972.

- Hernández, V. M., Reid, D. S., Mchugh, T. H., Berrios, J., & Krochta, J. M. (2008). Thermal transitions and extrusion of glycerol-plasticized whey protein mixtures. *Journal of Food Science*, 73, 169–175.
- Herranz, B., de la Hoz, L., Hierro, E., Fernández, M., & Ordóñez, J. A. (2005). Improvement of the sensory properties of dry-fermented sausages by the addition of free amino acids. *Food Chemistry*, 91, 673–682.
- Herrero, A. M., Cambero, M. I., Ordóñez, J. A., Castejón, D., Romero de Ávila, M. D., & de la Hoz, L. (2007). Magnetic Resonance Imaging, rheological properties and physico-chemical characteristics of meat systems with fibrinogen and thrombin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9357–9364.
- Herrero, A. M., Cambero, M. I., Ordóñez, J. A., De la Hoz, L., & Carmona, P. (2009b). Plasma powder as cold-set binding agent for meat system: Rheological and Raman spectroscopy study. *Food Chemistry*. 113, 493–499.
- Herrero, A. M., De La Hoz, L., Ordóñez, J. A., Castejón, D., Romero de Ávila, M. D., & Cambero, M. I. (2009a). Magnetic resonance imaging study of the cold-set gelation of meat systems containing plasma powder. *Food Research International*, 42, 1362–1372.
- Herrero, A. M., de la Hoz, L., Ordóñez, J. A., Herranz, B., Romero de Ávila, M. D., & Cambero, M. I. (2008). Tensile properties of meat cooked sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) parameters and physico-chemical characteristics. *Meat Science*, 80, 690–696.
- Herrero, A. M., Ordóñez, J. A., Romero de Ávila, M. D., Herranz, B., de la Hoz, L., & Cambero, M. I. (2007). Breaking strength of dry fermented sausages and their correlation with Texture Profile Analysis (TPA) and physico-chemical characteristics. *Meat Science*, 77, 331–338.
- Herrick, S., Blanc-Brude, O., Gray, A., & Laurent, G. (1999). Fibrinogen. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 31, 741–746.
- Hickson, D. W., Dill, C. W., Morgan, R. G., Suter, D. A., & Carpenter, Z. L. (1980). A comparison of heat-induced gel strengths of bovine plasma and egg albumen proteins. *Journal of Animal Science*, 51, 69–73.

- Higuchi, H., & Umazume, Y. (1985). Localization of the parallel elastic components in frog skinned muscle fibers studied by the dissociation of the A- and I-bands. *Biophysical Journal*, 48, 137–147.
- Hills, B. (1995). Food processing: an MRI perspective. *Trends in Food Science and Technology*, 6, 111–117.
- Hongsprabhas, P., & Barbut, S. (1999). Effect of pre-heated whey protein level and salt on texture development of poultry meat batters. *Food Research International*, 32 (2), 145–149.
- Hongsprabhas, P., & Barbut, S. (1999). Use of cold-set whey protein gelation to improve poultry meat batters. *Poultry Science*, 78, 1074–1078.
- Honikel, K. O. (1998). Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat Science*, 49, 447–457.
- Honikel, K. O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science*, 78, 68–76.
- Houben, J. H., & van't Hooft, B. J. (2005). Variations in product-related parameters during standardised manufacture of a semi-dry fermented sausage. *Meat Science*, 69 (2), 283–287.
- Howell, N. K., & Lawrie, R. A. (1983). Functional aspects of blood plasma proteins. I. Separation and characterization. *Journal of Food Technology*, 18, 747–762.
- Howell, N. K., & Lawrie, R. A. (1984). Functional aspects of blood plasma proteins. II. Gelling properties. *Journal of Food Technology*, 19, 289–295.
- Huang, C. C., & Lin L. S. (1996). Quality study of restructured meat made from admixture of chicken, rabbit meat and pork. *Livestock Research*, 29, 43–52.
- Huang, H. J. (1987). *Studies on the tested preparation of haemostat from porcine blood and its hemostating effect. Master Thesis*. National Chung-Hsing University. Taichung, Taiwan.
- Huff-Lonergan, E., & Lonergan, S. M. (2005). Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Science*, 71, 194–204.

- Hughes, L., Ledward, D. A., Mitchell, J. R., & Summerlin, C. (1980). The effect of some meat proteins on the rheological properties of pectate and alginate gels. *Journal of Texture Studies*, 11 (3), 247–256.
- Hull, D., & Clyne, T. W. (1996). *An introduction to composite materials*. Cambridge University Press.
- Hyun, C. K., & Shin, H. K. (1998). Utilization of bovine blood plasma obtained from a slaughterhouse for economic production of probiotics. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86 (1), 34–37.
- Ibáñez, C., Quitanilla, L., Cid, C., Astiasarán, I., & Bello, J. (1996). Dry fermented sausages elaborated with *Lactobacillus plantarum*-*Staphylococcus carnosus* part I: Effect of partial replacement of NaCl with KCl on the stability and the nitrosation process. *Meat Science*, 44, 227–234.
- Icekson, I., & Apelbaum, A. (1987). Evidence for transglutaminase activity in plant tissue. *Plant Physiology*, 84 (4), 972–974.
- Ikura, K., Kometani, T., Yoshikawa, M., Sasaki, R., & Chiba, H. (1980). Crosslinking of casein components by transglutaminase. *Agricultural and Biological Chemistry*, 44 (7), 1567–1573.
- Ikura, K., Sasaki, R., & Motoki, M. (1992). Use of transglutaminase in quality-improvement and processing of food proteins. *Comments on Agricultural and Food Chemistry*, 2, 389–407.
- INE (Instituto Nacional de Estadística). (2012). Encuesta industrial anual de empresas españolas de 2011. [http://www.ine.es/inebmenu/mnu\\_industria.htm](http://www.ine.es/inebmenu/mnu_industria.htm). Página consultada 22/04/2013.
- Ionescu, A., Aprodu, I., Daraba, A., & Porneala, L. (2008). The effects of transglutaminase on the functional properties of the myofibrillar protein concentrate obtained from beef heart. *Meat Science*, 79, 278–284.
- Ismail-Fitry, M. R., Paterson, A. H., Wilkinson, B. H., & Purchas, R. W. (2011). Initial work on developing a cooking protocol for producing re-structured meat under controlled conditions. *Procedia Food Science*, 1, 662–666.

- ISO (1996). Determination of chloride content. Part 1. Volhard method, Norma I.S.O 1841-1. International Organization for Standardization. Geneva
- Jager, I., & Fratz, P. (2000). Mineralized collagen fibrils: A mechanical model with a staggered arrangement of mineral particles. *Biophysical Journal*, 79, 1737-1746.
- Jantawat, P., Chinprahast, N., & Kristavee, D. (1996). Functional property of stored dried porcine plasma powders and its effect on sausage quality. *ASEAN Food Journal*, 11 (2), 69-73.
- Jarmoluk, A., & Pietrasik, Z. (2003). Response surface methodology study on the effects of blood plasma, microbial transglutaminase and j-carrageenan on pork batter gel properties. *Journal of Food Engineering*, 60, 327-334.
- Jiang, S. T., Hsieh, J. F., Ho, M. L., & Chung, Y. C. (2000). Microbial transglutaminase affects gel proprieties of gold threadfin-bream and pollack surimi. *Journal of Food Science*, 65, 694-699.
- Jimenez-Colmenero, F. (2000). Relevant factors in strategies for fat reduction in meat products. *Trends in Food Science and Technology*, 11, 56-66.
- Jimenez-Colmenero, F., Ayo, M. J., & Carballo, J. (2005). Physicochemical properties of low sodium frankfurter with added walnut: Effect of transglutaminase combined with caseinate, KCl and dietary fibre as salt replacers. *Meat Science*, 69, 781-788.
- Johnson, L. A., Havel, E. F., & Hoseney, R. C. (1979). Bovine plasma as a replacement for egg in cakes. *Cereal Chemistry*, 56, 339-342
- Johnson, R. A., & Haskell, J. H. (1983). Sampling properties of estimators of a Weibull distribution of use in the lumber industry. *Canadian Journal of Statistics*, 11, 155-169.
- Jürgensen, K., Aeschlimann, D., Cavin, V., Genge, M., & Hunziker, E. B. (1997). A new biological glue for cartilage-cartilage interfaces: tissue transglutaminase. *The Journal of Bone and Joint Surgery American Volume*, 79 (2), 185-193.
- Jürgensen, K., Aeschlimann, D., Cavin, V., Genge, M., & Hunziker, E. B. (1997). A new biological glue for cartilage-cartilage interfaces: tissue transglutaminase. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 79 (2), 185-193.

- Kanaji, T., Ozaki, H., Takao, T., Kawajiri, H., Ide, H., Motoki, M., & Shimonishi, Y. (1993). Primary structure of microbial transglutaminase from *Streptoverticillium* sp. strain S-8112. *Journal of Biological Chemistry*, 268 (16), 11565–11572.
- Kanegae, Y., Ohki, T., Soeda, T., & Yamazaki, K. (1993). Method of producing gelatin-sweets. *Japan Patent*, 6292521.
- Kang, I. J., Matsumura, Y., Ikura, K., Motoki, M., Sakamoto, H., & Mori, T. (1994). Gelation and properties of soybean glycinin in a transglutaminase-catalyzed system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 159–165.
- Kang, I. J., Matsumura, Y., Ikura, K., Motoki, M., Sakamoto, H., & Mori, T. (1994). Gelation and properties of soybean glycinin in a transglutaminase-catalyzed system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42 (1), 159–165.
- Kashiwagi, T., Yokoyama, K., Ishikawa, K., Ono, K., Ejima, D., Matui, H., & Suzuki, E. (2002). Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense*. *Journal of Biological Chemistry*, 277 (46), 44252–44260.
- Kato, A., Wada, T., Kobayashi, K., Seguro, K., & Motoki, M. (1991). Ovomucin-food protein conjugates prepared through the transglutaminase reaction (Food & Nutrition). *Agricultural and Biological Chemistry*, 55 (4), 1027–1031.
- Kato, Y. P., & Silver, F. H. (1990). Formation of continuous collagen fibres: evaluation of biocompatibility and mechanical properties. *Biomaterials*, 11, 169–175.
- Kato, Y. P., Christiansen, D. L., Hahn, R. A., Shieh, S.-J., Goldstein, J. D., & Silver, F. H. (1989). Mechanical properties of collagen fibres: a comparison of reconstituted and rat tail tendon fibres. *Biomaterials*, 10, 38–42.
- Kauffman, R. G., Eikelenboom, G., Van der Wal, P. G., Engel, B., & Zaar, M. (1986b). A comparison of methods to estimate water-holding capacity in post-rigor porcine muscle. *Meat Science*, 18 (4), 307–322.
- Kauffman, R. G., Eikelenboom, G., van der Wal, P. G., Merkus, G., & Zaar, M. (1986). The use of filter paper to estimate drip loss of porcine musculature. *Meat Science*, 18, 191–198.

- Kemi, V. E., Kärkkäinen, M. U., & Lamberg-Allardt, C. J. (2006). High phosphorus intakes acutely and negatively affect Ca and bone metabolism in a dose-dependent manner in healthy young females. *British Journal of Nutrition*, 96, (3), 545–552.
- Kendall, K., & Fuller, K. N. G. (1987). J-shaped stress/strain curves and crack resistance of biological materials. *Journal Physics, D: Applied Physics*, 20, 1596–1600.
- Kerr, W. L., Wang, X., & Choi, S. G. (2005). Physical and sensory characteristics of low-fat Italian sausage prepared with hydrated oat. *Journal of Food Quality*, 28 (1), 62–77.
- Kester, J. J., & Fennema, O. R. (1986). Edibles films and coatings: a review. *Food Technology*, 40, 47–59.
- Kikuchi, Y., Date, M., Yokoyama, K., Umezawa, Y., & Matsui, H. (2003). Secretion of active-form *Streptovorticillium mobaraense* transglutaminase by *Corynebacterium glutamicum*: processing of the pro-domain by a co-secreted subtilisin-like protease from *Streptomyces albogriseolus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 358–366.
- Kilcast, D. (2004). Force/deformation techniques for measuring texture. In D. Kilcast (Ed.). *Texture in food* (Vol. 2, pp. 109–145). Abington, Cambridge UK: Woodhead Publishing Ltd.
- Kim, J. H., Seong, P. N., Cho, S. H., Park, B. Y., Hah, K. H., Yu, L. H., Lim, D. G., Hwang, I. H., Kim, D. H., Lee, J. L., & Ahn, C. N. (2008). Characterization of nutritional value for twenty-one pork muscles. *Asian-australas. Journal Animal Science*, 21, 138–144.
- Kim, S. J., Moon, J. B., Kim, G. H., & Ha, C. S. (2008). Mechanical properties of polypropylene/natural fiber composites: Comparison of wood fiber and cotton fiber. *Polymer Testing*, 27, 801–806.
- Kim, S. Y., Jeitner, T. M., & Steinert, P.M. (2002). Transglutaminases in disease. *Neurochemistry International*, 40 (1), 85–103.
- King, J., Pablo, S., & Oca de, M. F. (1989). Evaluation of gelation and solubility of bovine plasma protein isolates. *Journal of Food Science*, 54, 1381–1390.
- Kinsella, J. E. (1984). Milk proteins: Physicochemical and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 21, 197–262.

- Kirk, O., Borchert, T. V., & Fuglsang, C. C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13 (4), 345–351.
- Klein, C. A. (2009). Characteristic strength, Weibull modulus, and failure probability of fused silica glass. *Optical Engineering*, 48 (11), 113401/1– 113401/10.
- Koohmaraie, M. (1994). Muscle proteinases and meat ageing. *Meat Science*, 36, 93–104.
- Krause, S. A., Unklesbay, N., & Eilersieck, M. (2002). Effects of calcium alginate and/or whey protein on physical and functional properties of ground venison. *Foodservice Research International*, 13 (3), 163–178.
- Kristensen, L., Purslow, P. P. (2001). The effect of ageing on the water-holding capacity of pork: role of cytoskeletal proteins. *Meat Science*, 58 (1), 17-23.
- Kröckel, L. (1995). Bacterial fermentation of meats. In *Fermented meats* (pp. 69-109). Springer US.
- Kumar, S., & Mehta, K. (2013). Tissue transglutaminase, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship?. *Amino acids*, 44 (1), 81–88.
- Kumazawa, Y., Sakamoto, H., Kawajiri, H., Seguro, K., & Motoki, M. (1996a). Determination of  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine in several fish eggs and muscle proteins. *Fisheries Science*, 62 (2), 331–332.
- Kuraishi, C., Nakagoshi, H., Tanno, H., & Tanaka, H. (2000). Application of transglutaminase for food processing. *Hydrocolloids*, 2, 281–285.
- Kuraishi, C., Sakamoto, J., Yamazaki, K., Susa, Y., Kuhara, C., & Soeda, T. (1997). Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking. *Journal of Food Science*, 62 (3), 488–490.
- Kuraishi, C., Yamazaki, K., & Susa, Y. (2001). Transglutaminase: its utilization in the food industry. *Food Reviews International*, 17 (2), 221–246.
- Kurth, L., & Rogers, P. J. (1984). Transglutaminase catalyzed crosslinking of myosin to soya protein, casein and gluten. *Journal of Food Science*, 49 (2), 573–576.
- Lambuth, A.L. (1977). In *Handbook of Adhesives*, Skeist, I, Blood Glues, p. 181, van Nostrand Reinhold Co., New York.



- Landis, W. J., Librizzi, J. J., Dunn, M. G., & Silver, F. H. (1995). A study of the relationship between mineral content and mechanical properties of turkey gastrocnemius tendon. *Journal of Bone and Mineral Research*, 10, 859–867.
- Larre, C., Kedzior, Z. M., Chenu, M. C., Viroben, G., & Gueguen, J. (1992). Action of transglutaminase on an 11S seed protein (*pea legumin*) - influence of the substrate conformation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40 (7), 1121–1126.
- Laskowski M. Jr., Donelly, T. H., Van Tijn, B. A., & Sheraga, H. A. (1956). The proteolytic action of thrombin on fibrinogen. *The Journal of Biological Chemistry*, 222, 815–821.
- Laurent, W., Bonny, J. M., & Renou, J. P. (2000). Muscle characterisation by NMR imaging and spectroscopic techniques. *Food Chemistry*, 69, 419–426.
- Law, N., Frost, C., & Wald, N. (1991). By how much does dietary salt reduction lower blood pressure. I – Analysis of observational data among populations. *British Medical Journal*, 302, 811–815.
- Lawless, H. T., & Heymann, H. (1998). Texture evaluation. In *Sensory evaluation of food*. New York, NY: Chapman & Hall.
- Lawn, B. R. (1993). *Fracture of brittle solids* (2<sup>nd</sup> ed). Cambridge University Press, Cambridge.
- Lee, Y. Z., Aishima, T., Nakai, S., & Sion, J. (1987). Optimization for selective fractionation of bovine plasma protein concentrate (BPPC) using polyethylene glycol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 35, 950–958.
- Lee, Y. Z., Johnson, L. A., Love, J. A., & Johnson, S. (1991). Effects of processing and usage level on performance of bovine plasma as an egg white substitute in cakes. *Cereal Chemistry*, 68, 100–104.
- Lennon, A. M., McDonald, K., Moon, S. S., Ward, P., & Kenny, T. A. (2010). Performance of cold-set binding agents in re-formed beef steaks. *Meat Science*, 85 (4), 620–624.
- Lepetit, J., & Culioli, J. (1994). Mechanical properties of meat. *Meat Science*, 36, 203–237.
- Lesort, M., Tucholski, J., Miller, M. L., & Johnson, G. V. (2000). Tissue transglutaminase: a possible role in neurodegenerative diseases. *Progress in Neurobiology*, 61 (5), 439–463.

- Lewis, G. J., & Purslow, P. P. (1989). The strength and stiffness of perimysial connective tissue isolated from cooked beef muscle. *Meat Science*, 26, 255–269.
- Liepe, H., Pueril, E., & Porobic, R. (1990). Influence of sugars and bacteria on dry sausage souring. *Fleischwirtschaft*, 70, 189–192.
- Losantos, A., Sanabria, C., Cornejo, I., & Carrascosa, A. V. (2000). Characterization of Enterobacteriaceae strains isolated from spoiled dry-cured hams. *Food Microbiology*, 17, 505–512.
- Lu, G. H., & Chen, T. C. (1999). Application of egg white and plasma powders as muscle food binding agents. *Journal of Food Engineering*, 42, (3), 147–151.
- Luciano, F. B., & Arntfield, S. D. (2012). Use of transglutaminases in foods and potential utilization of plants as a transglutaminase source – Review. *Biotemas*, 25 (4), 1–11.
- MacGregor, G. A., & De Wardener, H. E. (2002). Commentary: salt, blood pressure and health. *International Journal of Epidemiology*, 31 (2), 320–327.
- Machado, F. F., Coimbra, J. S. R., García Rojas, E. E., Minim, L. A., Oliveira, F. C., & Sousa, R. C. S. (2007). Solubility and density of egg white proteins: Effect of pH and saline concentration. *LWT-Food Science and Technology*, 40 (7), 1304–1307.
- Machovich, R. (1984). Thrombin and hemostasis. *The thrombin*, 1, 1-22.
- Machovich, R. (1986). Choices among the possible reaction routes catalyzed by thrombina. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 485 (1), 170-183.
- Machovich, R. (1986). Choices among the possible reaction routes catalyzed by thrombin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 485, 170–183.
- Maddock, R. J., Bidner, B. S., Carr, S. N., McKeith, F. K., Berg, E. P., & Savell, J. W. (2002). Creatine monohydrate supplementation and the quality of fresh pork in normal and halothane carrier pigs. *Journal of Animal Science*, 80, 997–1004.
- Madrid, A. (1999). Aprovechamiento de los subproductos cárnicos. 1ª Edición. Ediciones Mundi-Prensa. Editan A. Madrid Vicente, Ediciones.
- Magid, A. & Law, D. J. (1985). Myofibrils bear most of the resting tension in frog skeletal muscle. *Science*, 230, 1280–1282.

- MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). (2013). Panel de consumo alimentario en España (2012). <http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/panel-de-consumo-alimentario/ultimos-datos/>. Página consultada 21/04/2013.
- Maltin, C., Balcerzak, D., Tilley, R., & Delday, M. (2003). Determinants of meat quality: tenderness. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62, 337–347.
- Man, J. C., Rogosa, M., & Sharpe, M. E. (1960). An improved medium for *Lactobacillus* cultivation. *Journal of Applied Bacteriology*, 23, 130.
- Mandigo, R. W. (1988). *Restructured meats*. In R. Lawrie (Ed.), *Developments in meat science* (pp. 297–315). New York: Elsevier [4].
- Mangino, M. E. (1994). Protein interactions in emulsions: Protein–lipid interactions. In N. S. Hettiarachchy, & G. R. Ziegler (Eds.), *Protein functionality in food systems* (pp. 147–180). New York: Marcel Dekker.
- MARM. (2009). Datos de las Denominaciones de Origen Protegidas (D.O.P.) e indicaciones Geográficas Protegidas (I.G.P.) de Productos Agroalimentarios ([http://www.marm.es/es/alimentación/temas/calidad-agroalimentaria/INFORME\\_FINAL\\_VINCULADO\\_A\\_EXCEL\\_2009\\_tcm7-152858.pdf](http://www.marm.es/es/alimentación/temas/calidad-agroalimentaria/INFORME_FINAL_VINCULADO_A_EXCEL_2009_tcm7-152858.pdf))
- Márquez, E., Bracho, M., Archile, A., Rangel, L., & Benítez, B. (2005). Proteins, isoleucine, lysine and methionine content of bovine, porcine and poultry blood and their fractions. *Food Chemistry*, 93, 503–505.
- Martín Bejarano, S. (2001). Enciclopedia de la carne. Ediciones Martín y Macias. Vol. II, Cap. 67: Carnes reestructuradas, 1485–1508.
- Martín, A., Benito, M. J., Hernández, A., Pérez-Nevado, F., Córdoba, J. J., & Córdoba, M. G. (2008). Characterisation of microbial deep spoilage in Iberian dry-cured ham. *Meat Science*, 78, 475–484.
- Martín, V. (2010). Consumo de jamón en España. *Distribución y Consumo*, 110. (<http://www.marm.es>).

- Martín-Bejarano, S. (2001). Elaboración del jamón curado de cerdo blanco. In S. Martín-Bejarano (Ed.). *Enciclopedia de la carne y de los productos cárnicos, Vol. 2*, (pp. 1205–1219). Plasencia: Martín & Macías.
- Martínez-Navarrete, N., Camacho, M. M., Martínez-Lahuerta, J., Martínez-Monzó, J., & Fito, P. (2002). Iron deficiency and iron fortified foods—a review. *Food Research International*, 35 (2), 225–231.
- Matheis, G., & Whitaker, J. R. (1987). A review: enzymatic cross-linking of proteins applicable to foods. *Journal of Food Biochemistry*, 11 (4), 309–327.
- Matsumura, Y., Chanyongvorakul, Y., Kumazawa, Y., Ohtsuka, T., & Mori, T. (1996). Enhanced susceptibility to transglutaminase reaction of  $\alpha$ -lactalbumin in the molten globule state. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1292 (1), 69–76.
- McCarthy, M. J., Kauten, R. J. (1990). Magnetic resonance imaging applications in food research. *Trends in Food Science and Technology*, 1, 134–139.
- McLaughlin, N. B. (1987). Statistical models for failure of apple tissue under constant-strain-rate loading. *Journal of Texture Studies*, 18 (2), 173–186.
- Means, W. J., Clarke, A. D., Sofos, J. N., & Schmidt, G. R. (1987). Binding, sensory and storage properties of algin/calcium structured beef steaks. *Journal of the Food Science*, 52, 252–256.
- Means, W. J., Clarke, A. D., Sofos, J. N., & Schmidt, G. R. (1987). Binding, sensory and storage properties of algin/calcium structured beef steaks. *Journal of Food Science*, 52 (2), 252–256.
- Megard, D. (1987). Restructuration of meat products in presence of sodium alginate/calcium salt system. *Viandes et Produits Carnes*, 8.
- Mendoza, E., García, M. L., Casas, C., & Selgas, M. D. (2001). Inulin as fat substitute in low fat, dry fermented sausages. *Meat Science*, 57 (4), 387–393.
- Mielnik, M. B., Aaby, K., Rolfsen, K., Ellekjær, M. R., & Nilsson, A. (2002). Quality of comminuted sausages formulated from mechanically deboned poultry meat. *Meat Science*, 61, 73–84.

- Millington, P. F., & Wilkinson, R. (1983). *Skin: Biological structure and function*, 1<sup>st</sup> ed. Cambridge: Cambridge University Press.
- Min, B., & Green, B. W. (2008). Use of microbial transglutaminase and nonmeat proteins to improve functional properties of low NaCl, phosphate-free patties made from channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) belly flap meat. *Journal of Food Science*, 73 (5), E218–E226.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2007). Real Decreto 1469/2007, de 2 de noviembre, por el que se aprueba la norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo ibéricos. *Boletín Oficial del Estado de 3.11.2007*, 264, 45087–45104.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (1993). Orden de 3 de noviembre de 1993 por la que se ratifica el Reglamento de la Denominación de Origen “Jamón de Teruel” y su Consejo Regulador. *Boletín Oficial del Estado 30.11.1993*, 286, 33977.
- Ministerio de la Presidencia. (2003). Real Decreto 1376/2003, de 7 de noviembre, por el que se establecen las condiciones sanitarias de producción, almacenamiento y comercialización de las carnes frescas y sus derivados en los establecimientos de comercio al por menor. *Boletín Oficial del Estado de 14.11.2003*, 273, 40094–40101.
- Ministerio de la Presidencia. (2006). Real Decreto 640/2006, de 26 de mayo, por el que se regulan determinadas condiciones de aplicación de las disposiciones comunitarias en materia de higiene, de la producción y comercialización de los productos alimenticios. *Boletín Oficial del Estado de 27.05.2006*, 126, 19999–20002.
- Ministerio de la Presidencia. (2012). Real Decreto 1528/2012, de 8 de noviembre, por el que se establecen las normas aplicables a los subproductos animales y los productos derivados no destinados al consumo humano. *Boletín Oficial del Estado de 17.11.2012*, 277, 80199–80226.
- Mitchell, A. D., Scholz, A. M., Wang, P. C., & Song, H. (2001). Body composition analysis of the pig by magnetic resonance imaging. *Journal of Animal Science*, 79, 1800–1813.
- Monahan, F. J., & Troy, D. J. (1997). Overcoming sensory problems in low fat and low salts products. In A. M. Pearson & T. R. Dutson (Eds.), *Production and processing of*

- healthy meat, poultry and fish products. *Advances in meat research series* (Vol. 11, pp. 257–281). London: Chapman & Hall.
- Monin, G., Marinova, P., Talmant, A., Martín, J. F., Cornet, M., Lanore, D., & Grasso, F. (1997). Chemical and structural changes in dry-cured hams (Bayonne hams) during processing and effects of the dehairing technique. *Meat Science*, 42, 29–47.
- Monin, G., Talmant, A., Aillery, P., & Collas, G. (1995). Effects on carcass weight and meat quality of pigs dehaired by scalding or singeing post-mortem. *Meat Science*, 39, 247–254.
- Moreno, H. M., Carballo, J., & Borderias, A. J. (2008). Influence of alginate and microbial transglutaminase as binding ingredients on restructured fish muscle processed at low temperature. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88 (9), 1529–1536.
- Mor-Mur, M., & Yuste, J. (2003). High pressure processing applied to cooked sausage manufacture: Physical properties and sensory analysis. *Meat Science*, 65 (3), 1187–1191.
- Morrison, G. S., Webb, N. B., Blumer, T. N., Ivey, F. J. & Haq, A. (1971). Relationship between composition and stability of sausage- type emulsions. *Journal of Food Science*, 36, 426–430.
- Motoki, M., & Kumazawa, Y. (2000). Recent trends in transglutaminase technology for food processing. *Food Science Technology and Research*, 6 (3), 151–160.
- Motoki, M., & Nio, N. (1983). Crosslinking between different food proteins by transglutaminase. *Journal of Food Science*, 48 (2), 561–566.
- Motoki, M., & Seguro, K. (1994). Trends in Japanese soy protein research. *Inform* 5, 308– 313.
- Motoki, M., & Seguro, K. (1998). Transglutaminase and its use for food processing. *Trends in Food Science and Technology*, 9 (5), 204–210.
- Motoki, M., Kiyama, A., Nonaka, M., Tanaka, H., Uchio, R., Matura, A., Ando, H., & Umeda, K. (1989). *Japan Kokai Kokkyo Koho, JP 0217471*.

- Motoki, M., Nio, N., & Takinami, K. (1984). Functional properties of food proteins polymerized by transglutaminase. *Agricultural and Biological Chemistry*, 48 (5), 1257–1261.
- Motoki, M., Nio, N., & Takinami, K. (1987). Functional properties of heterologous polymer prepared by transglutaminase between milk casein and soybean globulin. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51 (1), 237–239.
- Motoki, M., Seguro, K., Nio, N., & Takinami, K. (1986). Glutamine-specific deamidation of  $\alpha$ -casein by transglutaminase (Food & Nutrition). *Agricultural and Biological Chemistry*, 50 (12), 3025–3030.
- Moure, F., Del Hoyo, P., Rendueles, M., & Díaz, M. (2008). Demineralization by ion exchange of slaughterhouse porcine blood plasma. *Journal of Food Process Engineering*, 31 (4), 517–532.
- Muguerza, E., Ansorena, D., & Astiasaran, I. (2003). Improvement of nutritional properties of chorizo de Pamplona by replacement of pork backfat with soy oil. *Meat Science*, 65 (4), 1361–1367.
- Muguerza, E., Gimeno, O., Ansorena, D., Bloukas, J. G., & Astiasarán, I. (2001). Effect of replacing pork back fat with pre-emulsified olive oil on lipid fraction and sensory quality of chorizo de Pamplona – a traditional Spanish fermented sausages. *Meat Science*, 59 (3), 251–258.
- Müller, M. F., Ris, H., Ferry, J. D. (1984). Electron microscopy of fine fibrin clots and fine and coarse fibrin films: observations of fibers in cross-section and in deformed states. *Journal of Molecular Biology*, 174, 369–384.
- Mutungi, G., Purslow, P., & Warkup, C. (1995). Structural and mechanical changes in raw and cooked single porcine muscle fibres extended to fracture. *Meat Science*, 40, 217–234.
- Mutungi, G., Purslow, P., & Warkup, C. (1996). Influence of temperature, fibre diameter and conditioning on the mechanical properties of single muscle fibres extended to fracture. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 72, 359–366.

- Myhara, R. M., & Kruger, G. (1998). The performance of decolorized bovine plasma protein as a replacement for egg white in high ratio white cakes. *Food Quality and Preference*, 9, 135–138.
- Nakamura, R., Hayakawa, S., Yasuda, K., & Sato, Y. (1984). Emulsifying properties of bovine blood globin: a comparison with some proteins and their improvement. *Journal of Food Science*, 49 (1), 102–104.
- Nedjar-Arroume, N., Dubois-Delval, V., Miloudi, K., Daoud, R., Krier, F., Kouach, M., & Guillochon, D. (2006). Isolation and characterization of four antibacterial peptides from bovine hemoglobin. *Peptides*, 27 (9), 2082–2089.
- Nielsen, P. M. (1995). Reactions and potential industrial applications of transglutaminase. Review of literature and patents. *Food Biotechnology*, 9 (3), 119–156.
- Nikovska, K., (2010). Oxidative stability and rheological properties of oil-in-water emulsions with walnut oil. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2 (3): 172–177.
- Nio, N., Motoki, M., & Takinami, K. (1985). Gelation of casein and soybean globulins by transglutaminase. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49 (8), 2283–2286.
- Noguchi, K., Ishikawa, K., Yokohama, K. I., Ohtsuka, T., Nio, N., & Suzuki, E. I. (2001). Crystal structure of red sea bream transglutaminase. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (15), 12055–12059.
- Nonaka, M., Matsuura, Y., & Motoki, M. (1996). Incorporation of lysine dipeptides into s1-Casein by  $\text{Ca}^{2+}$ -independent microbial transglutaminase. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 60, 131–133.
- Nonaka, M., Matsuura, Y., Nakano, K., & Motoki, M. (1997). Improvement of the pH-solubility profile of sodium caseinate by using  $\text{Ca}^{2+}$ -independent microbial transglutaminase with gelatin. *Food Hydrocolloids*, 11 (3), 347–349.
- Nonaka, M., Sakamoto, H., Toiguchi, S., Kawajiri, H., Soeda, T., & Motoki, M. (1992). Sodium caseinate and skim milk gels formed by incubation with microbial transglutaminase. *Journal of Food Science*, 57 (5), 1214–1218.



- Nonaka, M., Tanaka, H., Okiyama, A., Motoki, M., Ando, H., Umeda, K., & Matsuura, A. (1989). Polymerization of several proteins by  $\text{Ca}^{2+}$  independent transglutaminase derived from microorganisms. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53, 2619–2623.
- Novelli, E., Zanardi, E., Ghiretti, G. P., Campanini, G., Dazzi, G., Madarena, G., & Chizzolini, R. (1998). Lipid and cholesterol oxidation in frozen stored pork, salame milano and mortadella. *Meat Science*, 48 (1), 29–40.
- Nuthong, P., Benjakul, S., & Prodpran, T. (2009). Effect of some factors and pre-treatment on the properties of porcine plasma protein-based films. *LWT- Food Science and Technology*, 42, 1545–1552.
- O’Riordan, D., Kinsella, J. E., Mulvihill, D. M., & Morrissey, P. A. (1989). Gelation of plasma proteins. *Food Chemistry*. 33, 203–214.
- Ockerman, H. W., & Hansen, C. L. (2000). *Industrialización de subproductos de origen animal*. Editorial Acirbia, S. A.
- Ockerman, H. W., Basu, L., Crespo, F. L., & Sánchez, F. J. C. (2002). Comparison of European and American systems of production and consumption of dry-cured hams. *Des Moines: National Pork Board. American Meat Science Association*, 1–12.
- Odóñez, J. A., Cambero, M. I., Fernández, L., García, M. L., García de Fernando, G., De la Hoz, L. & Selgas, M. D. (1998). *Tecnología de los alimentos*, vol. II. Alimentos de origen animal. Editorial Síntesis, S. A. Madrid, España.
- Ofori, J. A., & Hsieh, Y. P. (2012). Chapter 13: The use of blood and derived products as food additives. *Food Additive*, Yehia El-Samragy (Ed.). In TechOpen, publicado el 22.02.2012, DOI: 10.5772/32374. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/food-additive/the-use-of-blood-and-derived-products-as-food-additives>
- Ohtsuka, T., Umezawa, Y., Nio, N., & Kubota, K. (2001). Comparison of deamidation activity of transglutaminases. *Journal of Food Science*, 66 (1), 25–29.
- Olmos, J. V. (2006). *Atlas Monte Nevado de anatomía del jamón serrano*. Edita Jamones Segovia, S.A.

- Opoku, A., Tabil, L. G., & Crerar, B. (2005). Rheological and physical properties of bovine fibrinogen-enriched plasma. *The Canadian society for engineering in agricultural, food and biological systems/ La société canadienne de génie agroalimentaire et biologique CSAE/SCGR*, paper N° 05-008.
- Orden Ministerial de 29 de junio de 1983, por la que se establece la Norma de Calidad para jamón cocido y fiambre de jamón, paleta cocida y fiambre de paleta y magro de cerdo cocido y fiambre de magro de cerdo. *Boletín Oficial del Estado de 05.07.1983*.
- Orden Ministerial de 5 de noviembre de 1981, por la que se aprueba la Norma Genérica de Calidad para los productos cárnicos tratados por el calor. *Boletín Oficial del Estado de 05.11.1981*, 268, 26300–26303.
- Orden Ministerial de 7 de febrero de 1980, por la que se aprueba la Norma de Calidad para los productos cárnicos embutidos crudos-curados en el mercado interior. *Boletín Oficial del Estado de 21.03.1980*, 70, 6280–6284.
- Ordóñez, J. A., & De La Hoz, L. (2001). Embutidos crudos curados. Tipos. Fenómenos madurativos. Alteraciones. In Martín & Macías, *Enciclopedia de la carne y de los productos cárnicos Vol. II*. (pp. 1063–1090). Cáceres, España.
- Orliac, O., Rouilly, A., Silvestre, F., & Rigal, L. (2003). Effects of various plasticizers on the mechanical properties, water resistance and aging of thermo-moulded films made from sunflower proteins. *Industrial Crops and Products*, 18, 91–100.
- Orthner, C. L., & Kosow, D. P. (1980). Evidence that human  $\alpha$ -thrombin is a monovalent cation-activated enzyme. *Archives of biochemistry and biophysics*, 202 (1), 63–75.
- Oshima, I., Iwamoto, H., Nakamura, Y. N., Takayama, K., Ono, Y., Murakami, T., Shiba, N., Tabata, S., & Nishimura, S. (2009). Comparative study of the histochemical properties, collagen content and architecture of the skeletal muscles of wild boar crossbred pigs and commercial hybrid pigs. *Meat Science*, 81, 382–390.
- Oshodi, A. A., & Ojokan, E. (1997). Effects of salts on some of the functional properties of bovine plasma protein concentrate. *Food Chemistry*, 59 (3), 333–338.
- Osorio, J. F., Ciro, J. V., & Mejía, L. G. (2005). Rheological and textural characterization of the Edam cheese. *Dyna*, 72, 33–45.

- Othner, C. L. & Kosow, D. P. (1980). Evidence that human  $\alpha$ -thrombin is a monovalent cation activated enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 202, 63–75.
- Otterburn, M., Healy, M., & Sinclair, W. (1977). The formation, isolation and importance of isopeptides in heated proteins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 86b, 239–262.
- Paardekooper, E. J. C., & Wijngaards, G. (1988). Composite meat product and method for the manufacture thereof. *International Patent No. 8501333*. Netherlands, issued May 3.
- Paarup, T., Nieto, J. C., Peláez, C., & Reguera, J. I. (1999). Microbiological and physicochemical characterisation of deep spoilage in Spanish dry-cured hams and characterisation of isolated Enterobacteriaceae with regard to salt and temperature tolerance. *European Food Research and Technology*, 209, 366–371.
- Papi, M., Arcovito, G., De Spirito, M., Amiconi, G., Bellelli, A., & Boumis, G. (2005). Simultaneous static and dynamic light scattering approach to the characterization of the different fibrin gel structures occurring by changing chloride concentration. *Applied Physics Letters*, 86, 183901–183903.
- Parés, D., Saguer, E., Saurina, J., Suñol, J. J., & Carretero, C. (1998). Functional properties of heat induced gels from liquid and spray-dried porcine blood plasma as influenced by pH. *Journal of Food Science*, 63 (6), 958–961.
- Parés, D., Saguer, E., Toldrà, M., & Carretero, C. (2000). Effect of high pressure processing at different temperatures on protein functionality of porcine blood plasma. *Journal of Food Science*, 65 (3), 486–490.
- Park, E., Lee H., Song, K.B. (1996). Characterization of plasma proteins from bloods of slaughtered cow and pig and utilization of the proteins as adhesives. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 39 (2), 123–126.
- Parolari, G., Virgili, R., & Schivazappa, C. (1994). Relationship between cathepsin B activity and compositional parameters in dry-cured hams of normal and defective texture. *Meat Science*, 38 (1), 117–122.

- Pasternack, R., Dorsch, S., Otterbach, J. T., Robenek, I. R., Wolf, S., & Fuchsbauer, H. L. (1998). Bacterial pro-transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense*. *European Journal of Biochemistry*, 257 (3), 570–576.
- Pasternack, R., Dorsch, S., Otterbach, J.T., Robenek, I.R., Wolf, S., & Fuchsbauer, H. (1998). Bacterial pro-transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense*. Purification, characterisation and sequence of the zymogen. *European Journal of Biochemistry*, 257, 570–576.
- Peleg, M. (1976). Texture analysis parameters obtained by an Instron universal testing machine. *Journal of Food Science*, 41, 721–722.
- Penteado, M. D. V. C., Lajolo, F. M., & Santos, N. P. D. (1979). Functional and nutritional properties of isolated bovine blood proteins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 30, 809–815.
- Phrukkanon, S., Burrow, M. F., & Tyas, M. J. (1998). The influence of cross-sectional shape and surface area on the microtensile bond test. *Dental Materials*, 14 (3), 212–221.
- Pierce, J. L., Cromwell, G. L., Lindemann, M. D., Russell, L. E., & Weaver, E. M. (2005). Effects of spray-dried animal plasma and immunoglobulins on performance of early weaned pigs. *Journal of Animal Science*, 83 (12), 2876–2885.
- Pins, G. D., & Silver, F. H. (1995). A self-assembled collagen scaffold suitable for use in soft and hard tissue replacement. *Materials Science and Engineering: C*, 3 (2), 101–107.
- Pins, G. D., Christiansen, D. L., Patel, R., & Silver, F. H. (1997). Self-assembly of collagen fibers. Influence of fibrillar alignment and decorin on mechanical properties. *Biophysical Journal*, 73, 2164–2172.
- Pisano, J. J., Finlayson, J. S., & Peyton, M. P. (1968). Cross-link in fibrin polymerized by factor XIII:  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)-lysine. *Science*, 160 (3830), 892–893.
- PPIMLA. (2001). Restructured meat using bovine plasma products. Available: [http://www.meatupdate.csiro.au/infosheets/Restructured Meat using Bovine Plasma Products.pdf](http://www.meatupdate.csiro.au/infosheets/Restructured_Meat_using_Bovine_Plasma_Products.pdf)

- Purslow, P. (1985). The physical basis of meat texture: observations on the fracture behaviour of cooked bovine M. *Semitendinosus*. *Meat Science*, 12, 39–60.
- Purslow, P. P., Wess, T. J., & Hukins, D. W. L. (1998). Collagen orientation and molecular spacing during creep and stress-relaxation in soft connective tissues. *Journal of Experimental Biology*, 201 (1), 135–142.
- Puszkín, E. G., & Raghuraman, V. (1985). Catalytic properties of a calmodulinregulated transglutaminase from human platelet and chicken gizzard. *Journal of Biological Chemistry*, 260 (29), 16012–16020.
- Raeker, M. O., & Johnson, L. A. (1995). Thermal and functional properties of bovine blood plasma and egg white proteins. *Journal of Food Science*, 60, 685–690.
- Raischel, F., Kun, F., & Herrmann, H. J. (2006). Failure process of a bundle of plastic fibers. *Physical Review E*, 73, (6), 066101.
- Ramírez, J., Uresti, R., Téllez, S., & Vázquez, M. (2002). Using salt and microbial transglutaminase as binding agents in restructured fish products resembling hams. *Journal of Food Science*, 67, 1778–1784.
- Ramos-Clamont, G., Fernandez-Michel, S., Carrillo-Vargas, L., Martinez-Calderon, E., & Vazquez-Moreno, L. (2003). Functional properties of protein fractions from porcine blood. *Journal of Food Science*, 68, 1196–1200.
- Ramos-Clamont, G., Fernández-Michel, S., Carrillo-Vargas, L., Martínez-Calderón, E., & Vázquez-Moreno, L. (2003). Functional properties of protein fractions isolated from porcine blood. *Journal of Food Science*, 68, (4), 1196–1200.
- Ratcliff, P. W., & Brooks, J. (1959). *Journal of the Science of Food and Agricultural*, 10, 625.
- Rawdkuen, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Lanier, T. C. (2004). Chicken plasma protein affects gelation of surimi from bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Hydrocolloids*, 18, 259–270.
- Regenstein, J. M. (1984). Protein–water interactions in muscle foods. *Reciprocal Meat Conference Proceedings*, 37, 44–51.

- Reglamento (CE) N° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008 sobre aditivos alimentarios. *Diario Oficial de la Unión Europea de 31.12.2008*, L354/16–L354/33.
- Reglamento (CE) N° 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004 relativo a la higiene de los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea de 30.04.2004*, L139/1–L139/54.
- Reglamento (CE) N° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004 por el que se establecen la normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. *Diario Oficial de la Unión Europea de 30.04.2004*, L139/55–L139/205.
- Reglamento (CE) N° 854/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano. *Diario Oficial de la Unión Europea de 30.04.2004*, L139/206–L139/321.
- Renou, J. P., Foucat, L., & Bonny, J. M. (2003). Magnetic resonance imaging studies of water interactions in meat. *Food Chemistry*, 82, 35–39.
- Richard, F. J. (1959). A flexible growth function for empirical use. *Journal of Experimental Botany*, 10, 290–300.
- Rico, E., Toldrá, F., & Flores, J. (1991). Effect of dry-curing process parameters on pork muscle cathepsins B, H and L activities. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 193, 541–544.
- Rodríguez Furlán, L. T., Pérez Padilla, A., & Campderrós, M. E. (2010). Functional and physical properties of bovine plasma proteins as a function of processing and pH, application in a food formulation. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2 (5), 256–267.
- Rodríguez Furlán, L. T., Pérez Padilla, A., & Campderrós, M. E. (2009). Procedure for obtaining a concentrated animal protein, and uses protein concentrate obtained. AR067798 A1. Argentina (In Spanish).

- Romero de Ávila, M. D., Ordóñez, J. A., De la Hoz, L., Herrero, A. M., & Cambero, M. I. (2010). Microbial transglutaminase for cold-set binding of unsalted/salted pork models and restructured dry ham. *Meat Science*, 84, 747–754.
- Romero de Ávila, M. D., Ordóñez, J. A., Escudero, R., Cambero, M. I. (2013). A study of plasma powder for cold-set binding of pork and restructured dry ham. *Meat Science*, en revisión.
- Roodink, H. B. J., & Zuijdweg, P. (2003). Preparation of blood plasma powder for bonding together pieces of foodstuff, e.g. meat, involves preparing fibrinogen concentrate from blood plasma, and spray-drying fibrinogen concentrate to form powder. *Patent Number(s): WO2003063607-A, WO2003063607-A1, NL1019873C2, AU2003203315-A1, EP1469740-A1, US2005170068-A1.*
- Roudot, A. C. (2004). *Reología y análisis de la textura de los alimentos*. Traducción Ángel Ignacio Negueruela Suberviola.
- Rowe, R. W. (1986). Elastin in bovine semitendinosus and longissimus dorsi muscles. *Meat Science*, 17, 293–312.
- Ruiz-Cabrera, M. A., Gou, P., Foucat, L., Renou, J. P., & Daudin, J. D. (2004). Water transfer analysis in pork meat supported by NMR imaging. *Meat Science*, 67, 169–178.
- Ruiz-Carrascal, J., & Regenstein, J. (2002). Emulsion stability and water uptake ability of chicken breast muscle proteins as affected by microbial transglutaminase. *Journal of Food Science*, 67, 734–739.
- Ruiz-Carrascal, J., Ventanas, J., Cava, R., Andrés, A. I., & García, C. (2000). Texture and appearance of dry cured ham as affected by fat content and fatty acid composition. *Food Research International*, 33, 91–95.
- Ruiz-Ramírez, J., Arnau, J., Serra, X., & Gou, P. (2005). Relationship between water content, NaCl content, pH and texture parameters in dry-cured muscles. *Meat Science*, 70 (4), 579–587.
- Rust, R., & Olson, D. (1988). Making good “lite” sausage. *Meat and Poultry*, 34, 10–16.

- Ruusunen, M., & Puolanne, E. (2005). Reducing sodium intake from meat products. *Meat Science*, 70, 531–541.
- Ryan, E. A., Mockros, L. F., Weisel, J. W., & Lorand, L. (1999). Structural origin of fibrin clot rheology. *Biophysical Journal*, 77, 2813–2826.
- Saguer, E., Fort, N., Alvarez, P. A., Sedman, J., & Ismail, A. A. (2008). Structure–functionality relationships of porcine plasma proteins probed by FTIR spectroscopy and texture analysis. *Food Hydrocolloids*, 22 (3), 459–467.
- Saguer, E., Fort, N., Parés, D., Toldrá, M., & Carretero, C. (2007). Improvement of gelling properties of porcine blood plasma using microbial transglutaminase. *Food Chemistry*, 101 (1), 49–56.
- Sakamoto, H., & Soeda, T. (1991). Minced meat products containing transglutaminase. *Japanese Kokai Tokkyo Koho, Japan Patent 03175929*.
- Sakamoto, H., Kumazawa, Y., Kawajiri, H., & Motoki, M. (1995).  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine crosslink distribution in foods as determined by improved method. *Journal of Food Science*, 60 (2), 416–419.
- Salgado, P. R., Fernández, G. B., Drago, S. R., & Mauri, A. N. (2011). Addition of bovine plasma hydrolysates improves the antioxidant properties of soybean and sunflower protein-based films. *Food Hydrocolloids*, 25, 1433–1440.
- Sanjeevi, R., Somanathan, N., & Ramaswamy, D. (1982). A viscoelastic model for collagen fibres. *Journal Biomechanics*, 15, 181–183.
- Santos, C., De la Hoz, L., Cambero, I., Cabeza, C., & Ordóñez, J. A. (2008). Enrichment of dry cured ham with  $\alpha$ -linolenic acid and  $\alpha$ -tocopherol by the use of linseed oil and  $\alpha$ -tocopheryl acetate in pig diets. *Meat Science*, 80, 668–674.
- Santos, C., Ordoñez, J. A., Cambero, M. I., D'Arrigo, M., & de la Hoz, L. (2004). Physicochemical characteristics of an  $\alpha$ -linolenic acid and  $\alpha$ -tocopherol enriched cooked ham. *Food Chemistry*, 88, 123–128.
- Sasaki, N., & Odajima, S. (1996). Elongation mechanism of collagen fibrils and force–strain relations of tendon at each level of structural hierarchy. *Journal Biomechanics*, 29, 1131–1136.



- Sathe, S. K., & Salunkle, D. K. (1981). Functional properties of the Great Northern Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins: emulsion, foaming, viscosity and gelation properties. *Journal of Food Science*, 46 (1), 71–74.
- Scanlon, M. G., & Long, A. E. (1995). Fracture strengths of potato tissue under compression and tension at two rates of loading. *Food Research International*, 28 (4), 397–402.
- Scheraga, H. A. (1983). Interaction of thrombin and fibrinogen and the polymerization of fibrin monomer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 408, 330–343.
- Scheraga, H. A. (2004). The thrombin-fibrinogen interaction. *Biophysical Chemistry*, 112, 117–130.
- Schmidt, G. R., & Trout, G. R. (1982). Chemistry of meat binding. In *Meat Science and Technology International Symposium Proceedings*. Lincoln, Nebraska (pp. 1–4).
- Schmidt, S. J., Sun, X. Z., & Litchfield, J. B. (1996). Applications of magnetic resonance imaging in food science. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36, 357–385.
- Schwartz, M. L., Pizzo, S. V., Hill, R. L., & Mckee, P. A. (1973). Human factor XIII from plasma and platelets. *Journal of Biological Chemistry*, 248, 1395–1407.
- Scott-Blair, G. W. (1958). Rheology in food research. *Advances in Food Research*, 8, 1–61.
- Secrist, J. L. (1987). Restructured meats – The past and present. In: *Advances in Meat Research*. (Vol. 3). Restructured meat and poultry products. Ed. A. M. Pearson and T. R. Dutson. Van Nostrand Reinhold Company Inc., New York, USA., 1–19.
- Seguro, K., Kumazawa, Y., Kuraishi, C., Sakamoto, H., & Motoki, M. (1996a). The  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine moiety in crosslinked casein is an available source of lysine for rats. *Journal of Nutrition*, 126 (10), 2557–2562.
- Seguro, K., Kumazawa, Y., Ohtsuka, T., Toiguchi, S., & Motoki, M. (1995a). Microbial transglutaminase and  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine crosslink effects on elastic properties of kamaboko gel. *Journal of Food Science*, 60 (2), 305–311.
- Seguro, K., Kumazawa, Y., Otsuka, T., Ide, H., Nio, N., Motoki, M., & Kubota, K. (1995b).  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine: hydrolysis by  $\gamma$ -glutamyltransferase of different origins, when

- free or protein bound. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43 (8), 1977–1981.
- Seguro, K., Nio, N., & Motoki, M. (1996b). Some characteristics of a microbial protein cross-linking enzyme: transglutaminase. *Macromolecular Interactions in Food Technology (ACS Symposium Series 650)*, pp. 271–280, American Chemical Society.
- Seideman, S. C., Smith, G. C., Carpenter, Z. L., & Dill, C. W. (1979). Plasma protein isolate and textured soy protein in ground beef formulation. *Journal of Food Science*, 44, 1032–1035.
- Serra, X., Ruiz-Ramírez, J., Arnau, J. & Gou, P. (2005). Texture parameters of dry-cured ham m. *Biceps femoris* samples dried at different levels as a function of water activity and water content. *Meat Science*, 69 (2), 249–254.
- Serrano, A., Cofrades, S., & Jiménez Colmenero, F. (2004). Transglutaminase as binding agent in fresh restructured beef steak with added walnuts. *Food Chemistry*, 85 (3), 423–429.
- Shaarani, S. M., Nott, K. P., & Hall, L. D. (2006). Combination of NMR and MRI quantitation of structure and structure changes for convection cooking of fresh chicken meat. *Meat Science*, 72, 398–403.
- Shahidi, F., & Synowiecki, J. (1997). Protein hydrolyzates from seal meat as phosphate alternatives in food processing applications. *Food Chemistry*, 60, 29–32.
- Shergold, O. A., Fleck, N. A., & King, T. S. (2006). The penetration of a soft solid by a liquid jet, with application to the administration of a needle-free injection. *Journal of Biomechanics*, 39, 2593–2602.
- Silva, J. G., Morais, H. A., & Silvestre, M. P. (2003). Comparative study of the functional properties of bovine globin isolates and sodium caseinate. *Food research international*, 36 (1), 73–80.
- Silver, F. (1987). *Biological materials: structure mechanical properties and modeling of soft tissues*, New York University Press, New York.
- Simpson, N. E., Grant, S. C., Blackband, S. J., & Constantinidis, I. (2003). NMR properties of alginate microbeads. *Biomaterials*, 24, 4941–4948.

- Singh, H. (1991). Modification of food proteins by covalent crosslinking. *Trends in Food Science and Technology*, 2, 196–200.
- Singh, R. N., & Mehta, K. (1994). Purification and characterisation of a novel transglutaminase from filarial nematode *Brugia malayi*. *European Journal of Biochemistry*, 225 (2), 625–634.
- Sjöberg, J. (1990). Disposición en cuchillos de punción. *Oficina Española de Patentes y Marcas*. Patente número ES 2 032 374 (Traducción de patente europea).
- Standeven, K. F., Ariëns, R. A. S., & Grant, P. J. (2005). The molecular physiology and pathology of fibrin structure/function. *Blood Reviews*, 19, 275–288.
- Stevens, M.P. (1999) Polymer chemistry: an introduction, Oxford University Press, New York, , 551.
- Stryer, L. (1988). *Biochemistry*. 3<sup>rd</sup> Edition. W. H. Freeman and Company, New York. USA, 248–251.
- Suklim, K., Flick, G. J., Marcy, J. E., Eigel, W. N., Haugh, C., & Granata, L. A. (2004). Effect of cold-set binders: alginates and microbial transglutaminase on the physical properties of restructured scallops. *Journal of Texture Studies*, 35 (6), 634–642.
- Sullivan J. D., & Lauzon P. H. (1986). Experimental probability estimators for Weibull plots. *Journal of Materials Science Letters*, 5 (12), 1245–1247.
- Sumena, K. B., Lucy, K. M., Chungath, J. J., Ashok, N., & Harshan, K. R. (2010). Regional histology of the subcutaneous tissue and the Sweat glands of large white yorkshire pigs. *Tamilnadu Journal Veterinary & Animal Sciences*, 6, 128–135.
- Suter, D. A., Sustek, E., Dill, C. W., Marshall, W. H., & Carpenter, Z. L. (1976). A method for measurement of the effect of blood protein concentrates on the binding forces in cooked ground beef patties. *Journal of Food Science*, 41, 1428–1432.
- Suzuki, T. (1981). Kamaboko (fish cake). In Fish and krill protein. Processing technology (pp. 62–191). London: Applied Science Publishers Ltd..
- Swales, J. (2001). Salt, blood pressure and health. *Nutrition Bulletin*, 26 (2), 133–139.

- Szczesniak, A. S. (1963). Classification of textural characteristics. *Journal of Food Science*, 28 (4), 385–389.
- Takagaki, Y., Narakawa, K., & Uchio, R. (1991). Coating of vegetables and fruits with transglutaminase and proteins for preservation. *Japanese Kokai Tokkyo Koho, Japan Patent 03272639*.
- Talreja, R. (1981). Estimation of Weibull parameters for composite material strength and fatigue life data. *Fatigue of Fibrous Composite Materials, ASTM STP, 723*, 291–311.
- Tani, T., Motoda, T., & Motoki, M. (1991). Process for highly polymerized gelatin. *Japan Patent, 3259928*.
- Tarté, R. (2009). Meat-Derived Protein Ingredients. In R. Tarté (Ed). *Ingredients in meat products: Properties, Funcionality and Applications* (pp 145–171). New York: Springer.
- Taylor, M. M., Bumanlag, L., Marmer, W. N., & Brown, E. M. (2006). Use of enzymatically modified gelatin and casein as fillers in leather processing. *The Journal of the American Leather Chemists Association*, 101 (5), 169–178.
- Téllez-Luis, S. J., Uresti, R. M., Ramírez, J. A., & Vázquez, M. (2002). Low salt restructured fish products using microbial transglutaminase as binding agent. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82 (9), 953–959.
- Teucher, B., Dainty, J. R., Spinks, C. A., Majsak-Newman, G., Berry, D. J., Hoogewerff, J. A., Foxall, R. J., Jakobsen, J., Cashman, K. D., Flynn, A., & Fairweather-Tait, S. J. (2008). Sodium and bone health: impact of moderately high and low salt intakes on calcium metabolism in postmenopausal women. *Journal of Bone and Mineral Research*, 23 (9), 1477–1485.
- Thomson, J. E., Jones, E. E., & Eisen, E. J. (1994). Effect of spray-dried porcine plasma protein on feed intake, growth rate, and efficiency of gain in mice. *Journal of animal science*, 72 (10), 2690-2695.
- Tingle, J. M., Pope, J. M., Baumgartner, P. A., & Sarafis, V. (1995). Magnetic resonance imaging of fat and muscle distribution in meat. *International Journal of Food Science and Technology*, 30, 437–446.

- Tokunaga, F., Mutant, T., Iwanaga, S., Ichinose, A., Davie, E. W., Kuma, K., & Mikata, T. (1993). Limulus hemocyte transglutaminase. cDNA cloning, amino acid sequence, and tissue localization. *Journal of Biological Chemistry*, 268 (1), 262–268.
- Toldrá, M., Elias, A., Parés, D., Saguer, E., & Carretero, C. (2004). Functional properties of a spray-dried porcine red blood cell fraction treated by high hydrostatic pressure. *Food Chemistry*, 88 (3), 461–468.
- Toldrá, F. (2002). *Dry-cured meat products*. Trumbull, Connecticut, USA: Food & Nutrition Press, Inc.
- Toldrá, F., Rico, E., & Flores, J. (1992). Activities of pork muscle proteases in model cured meat systems. *Biochimie*, 74 (3), 291–296.
- Torné, J. M., Rigau, J., Villalobos, E., Santos Lozano, M. A., & Talavera Baró, D. (2007). Secuencia de nucleótidos de maíz codificante de una proteína con actividad transglutaminasa, y su uso. *Patente ES 2 286 430*.
- Tritt, W. P., & Schuchardt, F. (1992). Materials flow and possibilities of treating liquid and solid wastes from slaughterhouses in Germany. A review. *Bioresource Technology*, 41 (3), 235–245.
- Trout, G. R. (1989). The effect of calcium carbonate and sodium alginate on the color and bind strength of restructured beef steaks. *Meat Science*, 25 (3), 163–175.
- Trout, G. R., & Schmidt, G. R. (1987). Non protein additives. In: *Advances in Meat Research*. (Vol. 3) Restructured meat and poultry products. Ed. A. M. Pearson and T. R. Dutson. Van Nostrand Company Inc., New York, USA. Pp. 307–313.
- Trustum, K., & Jayatilaka, S. (1979). On estimating the Weibull modulus for brittle material. *Journal of Materials Science*, 14 (5), 1080–1084.
- Tsai, C. M., Tseng, T. F., Yang, J. H., & Chen, M. T. (2006). Study on a binder by using porcine blood plasma transglutaminase, thrombin and fibrinogen. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 19 (1), 137–143.
- Tsai, C. M., Tseng, T. F., Yang, J. H., & Chen, M. T. (2006). Study on a binder by using porcine blood plasma transglutaminase, thrombin and fibrinogen. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 19 (1), 137–143.

- Tsai, M. H. (1987). Blood transfusion scopy. In: *Clinical hematology*. Pp. 111–177. Yi Hsien Publishing Co.
- Tseng, T. F., Liu, D. C., & Chen, M. T. (1999). Effect of transglutaminase on quality of low salt restructured meat chop. *Journal of the Chinese Agricultural Association*, 1, 229–236.
- Tseng, T. F., Tsai, C. M., Yang, J. H., & Chen, M. T. (2006). Porcine blood plasma transglutaminase combined with thrombin and fibrinogen as a binder in restructured meat. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 19 (7), 1054–1058.
- Tunick, M. H. (2000). Rheology of dairy foods that gel, stretch, and fracture. *Journal of Dairy Science*, 83, 1892–1898.
- Tybor, P. T., Dill, C. W., & Landmann, W. A. (1975). Functional properties of proteins isolated from bovine blood by a continuous pilot process. *Journal of Food Science*, 40, 155–159.
- Unión Europea. (2008). Reglamento (CE) nº 1332/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre enzimas alimentarias y por el que se modifican la Directiva 83/417/CEE del Consejo, el Reglamento (CE) nº 1493/1999 del Consejo, la Directiva 2000/13/CE, la Directiva 2001/112/CE del Consejo y el Reglamento (CE) nº 258/97. *Diario Oficial de la Unión Europea de 31.12.2008*, 354, 7–15.
- Unión Europea. (2009). Reglamento (CE) nº 1069/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009, por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales y los productos derivados no destinados al consumo humano y por el que se deroga el Reglamento (CE) nº 1774/2002 (Reglamento sobre subproductos animales). *Diario Oficial de la Unión Europea de 14.11.2009*, 300, 1–33.
- Unión Europea. (2011). Reglamento (UE) nº 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de octubre de 2011, sobre la información alimentaria facilitada al consumidor y por el que se modifican los Reglamentos (CE) nº 1924/2006 y (CE) nº 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, y por el que se derogan la Directiva 87/250/CEE de la Comisión, la Directiva 90/496/CEE del Consejo, la Directiva 1999/10/CE de la Comisión, la Directiva 2000/13/CE del Parlamento

- Europeo y del Consejo, las Directivas 2002/67/CE, y 2008/5/CE de la Comisión, y el Reglamento (CE) nº 608/2004 de la Comisión. *Diario Oficial de la Unión Europea* de 22.11.2011, 304, 18–63.
- United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (USDA/FSIS). (1995). Labeling and Consumer Protection. Questions and answers relating to use and labelling of ingredients, including flavorings, proprietary ingredient mixes, ingredients in standardized and non-standardized foods, and protein hydrolysates. Retrieved January 13, 2008, from: [http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/lare/Ingredients/PMC\\_QA.htm](http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/lare/Ingredients/PMC_QA.htm)
- United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (USDA/FSIS). (2005). Food Standards and labelling policy book. Retrieved October 20, 2007, from: [http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/larc/Policies/Labeling\\_Policy\\_Book\\_082005.pdf](http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/larc/Policies/Labeling_Policy_Book_082005.pdf)
- USDA/FSIS. (2005). *Food Standards and Labeling Policy Book*. Available: [http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/larc/Policies/Labeling\\_Policy\\_Book\\_082005.pdf](http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/larc/Policies/Labeling_Policy_Book_082005.pdf)
- Vaghefi, N., Nedjaoum, F., Guillochon, D., Bureau, F., Arhan, P., & Bouglé, D. (2002). Influence of the extent of hemoglobin hydrolysis on the digestive absorption of heme iron. An in vitro study. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(17), 4969–4973.
- Válková, V., Saláková, A., Buchtová, H., & Tremlová, B. (2007). Chemical, instrumental and sensory characteristics of cooked pork ham. *Meat Science*, 77, 608–615.
- Van Ginkel, S., Sung, S., & Lay, J. J. (2001). Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environmental Science and Technology*, 35, 4726–4730.
- Van-Hekken, D. L., & Strange, E. D. (1993). Functional properties of dephosphorylated bovine whole casein. *Journal of Dairy Science*, 76, 3384–3391.
- Varnam, A. H., & Sutherland, J. P. (1995). Uncooked, comminuted and reformed meat products. In *Meat and Meat Products. Technology, Chemistry and Microbiology*, Varnam, A. H., Sutherland, J. P., Eds., Chapman and Hall: London, U.K.

- Ventanas, J., Ruiz, J., & Córdoba, J. J. (2001). El jamón curado de cerdo ibérico: descripción del proceso tradicional de elaboración. En S. Martín-Bejarano (Ed.). *Enciclopedia de la carne y de los productos cárnicos, Vol. 2*, 1221–1245. Plasencia: Martín & Macías.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., Vandekinderen, I., Rajtak, U., & Debevere, J. (2006). The sensory acceptability of cooked meat products treated with a protective culture depends on glucose content and buffering capacity: A case study with *Lactobacillus sakei* 10A. *Meat Science*, 74, (3), 532–545.
- Veronda, D. R., & Westman, R. A. (1970). Mechanical characterisation of skin: finite deformations. *Journal of Biomechanics*, 3, 111–124.
- Viana, F. R., Silva, V. D. M., Delvivo, F. M., Bizzotto, C. S., & Silvestre, M. P. C. (2005). Quality of ham pate containing bovine globin and plasma as fat replacers. *Meat Science*, 70, 153–160.
- Vigneron, X. (1988). Restructuration des viandes. *Viandes Produits Carnés*, 9, 182–186.
- Vindigni, A., & Di Cera, E. (1996). Release of fibrinopeptides by the slow and fast forms of thrombin. *Biochemistry*, 35, 4417–4426.
- Virgil, R., Parolari, G., Schivazappa, C., Soresi-Bordini, C., & Born, M. (1995). Sensory and texture quality of dry-cured ham as affected by endogenous cathepsin B activity and muscle composition. *Journal of Food Science*, 60, 1183–1186.
- Visessanguan, W., Benjakul, S., & An, H. (2000). Porcine plasma proteins as a surimi protease inhibitor: effects on actomyosin gelation. *Journal of Food Science*, 65 (4), 607–611.
- Visessanguan, W., Soottawat, B., Riebroy, S., & Thepkasikul, P. (2004). Changes in composition and functional properties of proteins and their contributions to Nham characteristics. *Meat Science*, 66 (3), 579–588.
- Wachtman, J. B. (1996). *Mechanical behaviour of ceramics*. John Wiley & Sons Inc, New York, USA.
- Walter, T., Hertrampf, E., Pizarro, F., Olivares, M., Llaguno, S., Letelier, A., Vega, V., & Stekel, A. (1993). Effect of bovine hemoglobin fortified cookies on iron status of



- school children: a nation wide program in Chile. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57, 190–194.
- Wanasundara, J., Pegg, R. B., & Shand, P. J. (2003). Value added applications for plasma proteins from the beef processing industry. *Canadian Meat Science Association*, 10-15.
- Wang, J. Z., Zhang, H., Zhang, M., Yao, W. T., Mao, X. Y., & Ren, F. Z. (2008). Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions of porcine plasma albumin and globulin. *Journal of Food Biochemistry*, 32 (6), 693-707.
- Wang, J. Z., Zhang, M., Ren, F. Z., Han, B. Z., Wang, L., Chen, S. W., & Humera, A. (2007). Changes of chemical and nutrient composition of porcine blood during fermentation by *Aspergillus oryzae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23 (10), 1393–1399.
- Wang, K., McCarter, R., Wright, J., Beverly, J., & Ramirez-Mitchell, R. (1991). Regulation of skeletal muscle stiffness and elasticity by titin isoforms: A test of the segmental extension model of resting tension. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 7101–7105.
- Wang, M. C., Pins, G. D., & Silver, F. H. (1994) Collagen fibres with improved strength for the repair of soft tissue injuries. *Biomaterials*, 15, 507–512.
- Washizu, K., Ando, K., Koikeda, S., Hirose, S., Matsuura, A., Takagi, H., Motoki, M., & Takeuchi, K. (1994). Molecular cloning of the gene for microbial transglutaminase from *Streptoverticillium* and its expression in *Streptomyces lividans*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58 (1), 82–87.
- Watanabe, M., Suzuki, T., Ikezawa, Z., & Arai, S. (1994). Controlled enzymatic treatment of wheat proteins for production of hypoallergenic flour. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58, 388–390.
- Weaver, E. M., Russell, L. E., & Drew, M. D. (1995). The effect of spray-dried animal plasma fractions on performance of newly weaned pigs. *Journal of Animal Science*, 73, 81.

- Wei, J. T., & Chiang, B. H. (2009). Bioactive peptide production by hydrolysis of porcine blood proteins in a continuous enzymatic membrane reactor. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89 (3), 372-378.
- Weibull, W. (1959). *A Statistical Theory of Strength of Materials*. Royal Swedish Institute for Engineering Research, Stockholm.
- Weisel, J. W. (2004). The mechanical properties of fibrin for basic scientists and clinicians. *Biophysical Chemistry*, 112, 267–276.
- Weisel, J. W. (2005). Fibrinogen and fibrin. *Advances in Protein Chemistry*, 70, 247– 256.
- Wheeler, T. L., Shackelford, S. D., & Koohmaraie, M. (2000). Variation in proteolysis, sarcomere length, collagen content, and tenderness among major pork muscles. *Journal of Animal Science*, 78 (4), 958–965.
- Wheeler-Kingshott, A. M., Barker, G. J., Steens, S. C. A., Van Buchem, M. (2003). ADC: The diffusion of water. In *Quantitative MRI of the Brain. Measuring Changes Caused by Disease*, pp 203–210. Tofts, P., Ed., Wiley: West Sussex, U.K..
- Whitaker, J. R. (1977). In: Feeney RE, Whitaker, J. R. (Eds.) Food proteins-improvement through chemical and enzymatic modification. *American Chemical Society*, Washington, D.C., pp 95–105.
- Whiting, R. C. (1984). Stability and gel strength of frankfurter batters made with reduced NaCl. *Journal of Food Science*, 49, 1350–1354.
- Whiting, R. C. (1987). Influence of various salts and water soluble compounds on water and fat exudation and gel strength of meat batters. *Journal of Food Science*, 52, 1130–1132, 1158.
- Whiting, R. C. (1988). Solute-protein interactions in a meat batter. *Reciprocal Meat Conference Proceeding*, 41, 53–56.
- Wijngaards, G., & Paardekooper, E. J. C. (1988). Preparation of a composite by means of an enzymatically formed protein gel. In Krol, B., Van Roon, P. S., & Houben, J. H. (Eds.). *Trends in Modern Meat Technology*, (2<sup>nd</sup>ed.), (pp. 125–130). Wageningen:Pudoc.

- Wilde, P., Mackie, A., Husband, F., Gunning, P., & Morris, V. (2004). Proteins and emulsifiers at liquid interfaces. *Advances in colloid and interface Science*, 108, 63–71.
- Wilhelm, B., Meinhardt, A., & Seitz, J. (1996). Review. Transglutaminases: purification and activity assays. *Journal of Chromatography B*, 684, 163–177.
- Willems, M. E. T., & Purslow, P. P. (1996). Effect of post-rigor sarcomere length on mechanical and structural characteristics of raw and heat denatured single porcine muscle fibres. *Journal of Texture Studies*, 27, 217–233.
- Winzor, D. J., & Scheraga, H. A. (1964). Titration behavior of bovine thrombin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 104 (2), 202–207.
- Wu, Y. C. (2002). Development of sectioned and formed meat products using deboned meats. Issues in Asian Agriculture 2002-10-01. Food Fertilizer Technology Center. Taipei. (<http://www.ffc.agnet.org/>).
- Wuhrmann Wunderly, F. (1954). *Las proteínas sanguíneas en el hombre*. Editorial Científico – Médica. 2ª Ed. Barcelona – Lisboa – Madrid.
- Xu, X., Cao, R., He, L., & Yang, N. (2009). Antioxidant activity of hydrolysates derived from porcine plasma. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89 (11), 1897–1903.
- Yang, J.-H., & Lin, C.-W. (1998). Functional properties of porcine blood globin decolourized by different methods. *International Journal of Food Science and Technology*, 33, 419–427.
- Yasueda, H., Kumazawa, Y., & Motoki, M. (1994). Purification and characterization of a tissue-type transglutaminase from Red Sea Bream (*Pagrus major*). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58 (11), 2041–2045.
- Yasueda, H., Nakanishi, K., Kumazawa, Y., Nagase, K., Motoki, M., & Matsui, H. (1995). Tissue-type transglutaminase from red sea bream (*Pagrus major*). Sequence analysis of the cDNA and functional expression in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 232, 411–419.
- Yee, V. C., Pedersen, L. C., Le Trong, I., Bishop, P. D., Stenkamp, R. E., & Teller, D. C. (1994). Three-dimensional structure of a transglutaminase: human blood

- coagulation factor XIII. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(15), 7296–7300.
- Yee, V. C., Pedersen, L. C., Trong, I. L., Bishop, P. D., Stenkamp, R. E., & Teller, D. C. (1994). Tree-dimensional structure of a transglutaminase: human blood coagulation factor XIII. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 91, 7296–7300.
- Yeh, Y. W. (2000). *Purification, biochemical character and application of transglutaminase from Streptovorticilium kentuckense CCRC 12429. Master Thesis*. National Chung-Hsing University. Taichung, Taiwan.
- Yilmaz, I., Simsek, O., & Isikli, M. (2002). Fatty acid composition and quality characteristics of low-fat cooked sausages made with beef and chicken meat, tomato juice and sunflower oil. *Meat Science*, 62 (2), 253–258.
- Yokoyama, K., Nio, N., & Kikuchi, Y. (2004). Properties and applications of microbial transglutaminase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64 (4), 447–454.
- Zanardi, E., Novelli, E., Ghiretti, G. P., & Chizzolini, R. (2000). Oxidative stability of lipids and cholesterol in salame Milano, coppa and Parma ham: Dietary supplementation with vitamin E and oleic acid. *Meat Science*, 55, 169–175.
- Zeugolis, D. I., Paul, R. G., & Attenburrow, G. (2008). Post-self-assembly experimentation on extruded collagen fibres for tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia*, 4, (6), 1646–1656.
- Zhang, J., & Masui, Y. (1997). Role of amphibian egg transglutaminase in the development of secondary cytotstatic factor *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*, 47 (3), 302–311.
- Zhao, Y., Ma, E., & Xu, J. (2008). Reliability of compressive fracture strength of Mg–Zn–Ca bulk metallic glasses: Flaw sensitivity and Weibull statistics. *Scripta Materialia*, 58 (6), 496–499.
- Zheng, M., Du, G., & Chen, J. (2000). A strategy of temperature control in batch microbial transglutaminase fermentation. *Chinese Journal of Biotechnology*, 6, 759–762.

- Zheng, M., Du, G., & Chen, J. (2002a). pH control strategy of batch microbial transglutaminase production with *Streptoverticillium mobaraense*. *Enzyme and Microbial Technology*, 31 (4), 477–481.
- Zheng, M., Du, G., Guo, W., & Chen, J. (2001). A temperature-shift strategy in batch microbial transglutaminase fermentation. *Process Biochemistry*, 36 (6), 525–530.
- Zhu, Y., & Tramper, J. (2008). Novel applications for microbial transglutaminase beyond food processing. *Trends in Biotechnology*, 26, (10), 559–565.
- Zhu, Y., Rinzema, A., Tramper, J., & Bol, J. (1995). Microbial transglutaminase - A review of its production and application in food processing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44 (3-4), 277–282.
- Ziegler, G. R., & Foegeding, E. A. (1990). The gelation of proteins. *Advances in Food and Nutrition Research*, 34, 203–298.
- Zotzel, J., Keller, P., & Fuchsbaauer, H. L. (2003). Transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* is activated by an endogenous metalloprotease. *European Journal of Biochemistry*, 270 (15), 3214–3222.

El camino hasta aquí ha sido largo, sobre todo en las últimas jornadas porque nos faltaba un amigo.

A ti, Lorenzo de los tres.







